Untersuchungen über den relativen Treffbereich verschiedener Genfunktionen von Hühner-Leukose-Sarkomatose-Viren

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

THOMAS GRAF
aus Wien

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543901_0099

Untersuchungen über den relativen Treffbereich verschiedener Genfunktionen von Hühner-Leukose-Sarkomatose-Viren

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

THOMAS GRAF
aus Wien

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juni 1969

Dekan: Professor Dr. A. Seilacher

1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Schäfer

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Seyffert

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1966 bis November 1968 am Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Dr. W. Schäfer danke ich für sein Interesse und die freundliche Unterstützung, die er vorliegender Arbeit zuteil werden ließ. Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Bauer bin ich für die Überlassung des Themas, für seine Anleitung und für vielseitige Anregungen zu besonderem Dank verpflichtet. Herrn Dipl. Math. R.J. Lorenz danke ich für seine Hilfe bei den statistischen Berechnungen, Herrn Dr. H. Strack für vielseitige Anregungen und Diskussionen und Herrn Dr. H. Frank für seine Hilfe bei den elektronenoptischen Techniken. Fräulein C. Allgaier, A. Seydel und P. Troxell leisteten wertvolle Hilfe bei der Durchführung vieler Versuche. Nicht zuletzt sei Herrn Dr. G. Bergold gedankt, durch dessen Anregungen ich mich dem Gebiet der Virusforschung zuwandte.

Das Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela, unterstützte mich in einem Teil meiner Studienausbildung.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN RELATIVEN TREFFBEREICH VERSCHIEDENER GENFUNKTIONEN VON HÜHNER-LEUKOSE-SARKOMATOSE-VIREN

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
	A. Zur Geschichte und Systematik der Tumorviren	1
	B. Eigenschaften der Hühner-Leukose-Sarkomatose-Viren	2
	C. Problemstellung	8
II.	MATERIAL	13
	A. Virusstämme	13
	B. Hühner	14
	C. Nährmedien	14
	D. Lösungen	15
	E. Herkunft weiterer Chemikalien	17
III.	METHODEN	18
	A. Züchtung von Zellkulturen	18
	B. Prüfung der Hühnerfibroblasten auf Virusresistenz	19
	C. Bestimmung virusspezifischer biologischer Aktivitäten	20
	1. Gruppenspezifisches (gs) Antigen	21
	2. V-Antigen	21
	3. Infektiosität des AMV	23
	4. Onkogenität und Infektiosität des RSV	28
	D. Abschätzung der AMV-Konzentration im ATPase-Test	28
	E. Produktion von Virus	30
	1. in vivo	30
	2. in vitro	30
	F. Behandlung von Virus mit inaktivierenden Agenzien	31

Seite

G. Biophysikalische Methoden 33
1. Zentrifugation 33
2. Zählung der Zellen 34
3. Bestimmung der Radioaktivität 34
4. Elektronenmikroskopie 34

IV. ERGEBNISSE 36
A. Vorversuche 36
1. Inaktivierung der Onkogenität des RSV sowie der Infektiosität des AMV 36
2. Wirkung des Hydroxylamins auf verschiedene Bestandteile des AMV 41
3. Verhinderung von Sekundärinfektionen 49
B. Hauptversuche 53
1. AMV als Modellvirus für das Studium der differentiellen Inaktivierung 53
a) Inaktivierungskinetiken von AMV-Genfunktionen nach HA-Behandlung 55
α) Infektiosität und Infektiosität der Nachkommenschaft 55
ß) Bildung von gs- und V-Antigen 55
b) Kontrollversuch zur differentiellen Inaktivierung 60
2. RSV als Modellvirus für das Studium der differentiellen Inaktivierung 63
a) Inaktivierungskinetiken von RSV-Eigenschaften nach HA-Behandlung 64
α) Onkogenität 64
ß) Infektiosität 67
γ) Bildung physikalischer Virusteilchen 71
b) Untersuchung der differentiellen Inaktivierung nach Bestrahlung des RSV 73
c) Statistische Berechnungen 78

V. ABSCHLIESSENDE BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 86

VI. ZUSAMMENFASSUNG 95

VII. LITERATURVERZEICHNIS 96

I. EINLEITUNG

A. Zur Geschichte und Systematik der Tumorviren

Die erste Veröffentlichung über Tumorviren liegt bereits über 60 Jahre zurück. Ellermann und Bang berichteten darin von der zellfreien Übertragung des Erregers der Hühner-Myeloblastose (41). Drei Jahre später folgte eine Mitteilung von Rous über die erfolgreiche zellfreie Übertragung eines Hühnersarkoms (73). Die Tatsache, daß onkogene Viren weitverbreitet sind, fand aber erst in den letzten Jahren allgemeine Beachtung, als aufgrund der rapiden Entwicklung der Molekularbiologie und Virusforschung die Voraussetzungen für eine eingehende Untersuchung der Virusonkogenese geschaffen wurden.

Die Tumorviren bilden keine einheitliche Gruppe in der Reihe der animalen Viren. Die bestuntersuchten Tumorviren sind die DNS-haltigen Papovaviren (Papilloma-, Polyoma-Virus und SV40) und bestimmte Adenoviren. Bei den RNS-haltigen tumorerzeugenden Virusarten lassen sich bisher drei Gruppen unterscheiden: die Hühner-Leukose-Sarkomatose-Viren (HLS-Viren), die Mäuse-Leukämie-Viren und das Mäuse-Mamma-Karzinom-Virus. Zwischen den DNS- und RNS-haltigen Tumorviren existieren grundlegende Unterschiede (80): Im Gegensatz zu den DNS-haltigen Tumorviren, die zumeist kubisch-symmetrisch aufgebaut sind, besitzen die RNS-haltigen eine relativ komplexe, an die Myxoviren erinnernde Struktur. Während die RNS-Viren sehr häufig Spontantumoren in verschiedenen Tierspezies erzeugen, sind bei den DNS-haltigen Tumorviren, mit Ausnahme einiger erst kürzlich entdeckter Herpes-

virus-ähnlicher Erreger (20,60), keine Vertreter bekannt, die nach natürlicher Infektion Tumoren verursachen. Auch in der Art des Reifungsmechanismus unterscheiden sich die RNS-haltigen von den DNS-haltigen Tumorviren: erstere werden wie die Myxoviren in Vorstülpungen der Zellmembran, letztere im Cytoplasma oder Kern gebildet. Die RNS-haltigen Tumorviren der verschiedenen Tierspezies sind morphologisch kaum voneinander zu unterscheiden und enthalten auch eine etwa gleiche Menge von RNS. Serologische Beziehungen bestehen aber zwischen ihnen nicht.

Zu den bestuntersuchten RNS-Tumorviren gehören die HLS-Viren. Eine zusammenfassende Beschreibung ihrer Eigenschaften wurde zuletzt von Vogt publiziert (98). Sie sind serologisch durch ein allen gemeinsames, sogenanntes gruppenspezifisches (gs) Antigen charakterisiert. Die Hühner-Leukose-Viren (HL-Viren) erzeugen vor allem Tumoren im hämatopoietischem System, während die Hühner-Sarkom-Viren (HS-Viren) Fibrosarkome induzieren. Die HS-Viren sind in der Lage, Hühnerembryofibroblasten in vitro zu transformieren, was an der morphologischen Veränderung der Zellen erkannt wird. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist das Rous-Sarkom-Virus (RSV).

B. Eigenschaften der Hühner-Leukose-Sarkomatose-Viren

Struktur

Die HLS-Viren haben einen Durchmesser von 80 - 120 mμ (Abb. 1,7). Sie enthalten eine innere und eine mit knopfförmigen Fortsätzen besetzte äußere Membran (18). Mög-

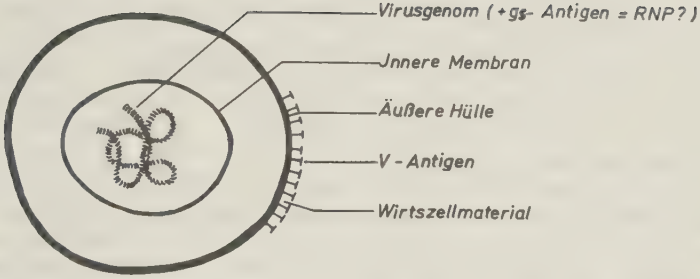

Abb. 1: Schematische Darstellung der Struktur eines HLS-Virus.

licherweise entsprechen die Fortsätze dem Hüll- oder Virus (V)-Antigen. Das V-Antigen wird u.a. durch den Neutralisationstest erfaßt und ist typspezifisch (52). Es konnte bisher noch nicht isoliert und charakterisiert werden. Das von der inneren Membran umschlossene Nucleoid mit einem Durchmesser von 35 - 40 mu (18) enthält die Virus-RNS. Sie liegt wahrscheinlich ebenso wie bei den Myxoviren in Form eines Ribonucleoproteins (RNP) vor (12, 39). Da es sich gezeigt hat, daß das gs-Antigen im Inneren der Virusteilchen lokalisiert ist (15), könnte das Protein des RNP-Komplexes dem gs-Antigen entsprechen. Das Virus enthält verschiedene RNS-Komponenten, von denen eine hochmolekulare, einsträngige Form ($S_{20} \sim 65$ S) mit einem Mol-Gewicht von $\sim 10^7$ wahrscheinlich das eigentliche Virusgenom darstellt (10,73,74). Bei weiteren aus dem Virus extrahierten RNS-Fraktionen (S_{20} 4 - 30 S) handelt es sich wahrscheinlich um zelleigene Materialien (11,21). Ein Virusteilchen enthält insgesamt ca. 2,2 % RNS, 60 % Proteine und 35 % Lipide (22). Auch ein Teil der Proteine und Lipide sind wirtszellspezifische Komponenten. Sie lassen sich mit den üblichen Reinigungsverfahren nur unvollständig von den Viruspartikeln entfernen. Im Vergleich zu anderen Viren sind die HLS-Viren sehr instabil. Bei 37° C beträgt ihre Halbwertszeit nur 2 - 6 Stunden (98).

Vermehrung in vivo

Der natürliche Wirt der HLS-Viren ist das Huhn. Im allgemeinen wird bei dieser Tierart in den innerhalb weniger Wochen nach Infektion entstehenden Tumoren infektiöses Virus produziert, dessen Menge beachtlich groß sein kann.

So enthalten an Myeloblastose erkrankte Hühner bis zu 10^{12} Viruspartikeln/ml Blutplasma (18).

Von den verschiedenen HLS-Viren läßt sich das RSV auf eine Vielzahl von Geflügelarten übertragen (98). Überraschend war, daß es auch nach parenteraler Übertragung auf Ratten Sarkome induzierte (89). In der Folge konnten mit ihm auch Tumoren in einer Reihe anderer Säugetiere einschließlich Primaten (64,109) erzeugt werden. Im Gegensatz zu den im Geflügel induzierten Tumoren produzieren die in Säugern erzeugten in der Regel kein Virus. Daß in diesen dennoch die volle genetische Information für das RSV erhalten ist, beweist die Rückübertragung solcher Zellen auf das Huhn: In den hier neu entstehenden Tumoren wird wieder infektiöses Virus gebildet (90). Dieses Phänomen läßt sich auch in vitro durch Kokultivierung transformierter Säugerzellen mit Hühnerfibroblasten reproduzieren (85).

Im Gegensatz zum RSV konnten mit HL-Viren bisher nur Vögel infiziert werden. Sie erzeugen hier Tumoren verschiedener Art (25), können die Tiere aber auch latent infizieren, ohne daß es zur Entstehung von Tumoren kommt (76).

Vermehrung in vitro

Beobachtungen an in vitro kultivierten Wirtszellen ergaben, daß die Infektion mit HLS-Viren etwa folgendermaßen verläuft: Die für die Infektion verwendeten Viruspartikeln werden sehr schnell an die Wirtszellen adsorbiert. Da dies bei resistenten Zellkulturen in etwa

gleichem Maße wie bei empfänglichen geschieht (29,68,87), scheint der entsprechende Vorgang ein relativ unspezifischer Prozeß zu sein. Innerhalb 1 Stunde nach der Infektion treten ca. 95 % der Virusteilchen in die Eklipsphase ein (88), in der sie nicht mehr als infektiöse Teilchen erfaßt werden können. Bei der anschließenden Penetration in die Zelle scheint das V-Antigen mitzuwirken (88, s.S.8,22). Neusynthetisiertes Virus erscheint schließlich ca. 16 Stunden nach der Infektion (95,106). Am 3. - 4. Tage erreicht der Virustiter ein Plateau. Man nimmt an, daß nunmehr ebensoviel Virus zerfällt, wie neugebildet wird (105).

Im Gegensatz zu den meisten übrigen Viren können die HLS-Viren ihre Wirtszellen nur dann infizieren, wenn letztere in der Lage sind, sich zu teilen (94). Hemmt man die Replikation durch Zugabe bestimmter DNS-Inhibitoren in den ersten 8 - 12 Stunden nach der Infektion, dann wird sowohl die Ausprägung der Transformation als auch die Virussynthese unterdrückt. Eine Zugabe der Inhibitoren zu einem späteren Zeitpunkt führt dagegen zu keinem Hemmeffekt mehr (6,7,65). Aus weiteren Versuchen wurde geschlossen, daß für die späten Phasen der Infektion zwar keine DNS-Synthese jedoch eine DNS-abhängige RNS-Synthese notwendig ist (5,8,92,93).

Klassifizierung der HLS-Viren

Schon bei den ersten Übertragungsexperimenten mit HLS-Viren fiel auf, daß bestimmte Hühner bzw. Hühnerherden gegenüber einer Infektion mit RSV resistent waren (72). Eine solche Resistenz wurde später auch bei den in der

Gewebekultur gezüchteten Hühnerzellen gefunden. Sie beruht, wie wir heute wissen, entweder auf einer Interferenz durch ein bereits in den betreffenden Tieren bzw. Zellen vorhandenes Virus oder auf einer genetischen Resistenz.

1960 isolierte Rubin aus dem Überstand resistenter Zellkulturen ein Agens, welches nach Übertragung auf empfängliche Zellen diese weitgehend gegen eine Überinfektion mit RSV schützte (74). Er konnte zeigen, daß der sogenannte "resistance inducing factor" (RIF) ein HL-Virus ist (44,75). Aufgrund dieses Befundes wurde später ein Interferenztest zur Bestimmung des Infektiositätstiters von HL-Viren entwickelt (77,106).

Bei Hühnerfibroblastenkulturen, die kein derartiges interferierendes Virus enthielten, konnte der Nachweis erbracht werden, daß hier eine durch den Genotyp des Wirtes bedingte Resistenz vorhanden ist, die sich spezifisch gegen bestimmte HLS-Virusstämme richtet (30). Diese Entdeckung führte zur Einteilung der HLS-Viren in zwei Untergruppen (51,99), die später mit A und B bezeichnet wurden (103,104). Der Einfachheit halber werden in vorliegender Arbeit Viren der Untergruppen A und B auch als A- bzw. B-Viren bezeichnet. Für Zellen, die für beide Virustypen empfänglich sind, wurde die Bezeichnung C/O, für solche die resistent gegen A, B oder beide Typen sind, C/A, C/B bzw. C/AB eingeführt (103). Die Empfänglichkeit wird durch zwei autosomale, dominante und für die Untergruppen A und B verschieden lokalisierte Gene bestimmt (31).

Ebenso wie die genetische Resistenz ist die Interferenz

spezifisch. A-Viren interferieren nur mit Viren der gleichen Untergruppe, nicht dagegen mit B-Viren und umgekehrt (104). Sowohl der Wirtsbereich, wie die Eigenschaft, spezifisch zu interferieren, scheinen auf Seiten des Virus durch das typspezifische V-Antigen bestimmt zu werden. In der Regel wird nämlich eine Kreuzneutralisation nur innerhalb einer Untergruppe, nicht jedoch zwischen Vertretern verschiedener Untergruppen gefunden (52).

Basierend auf den drei Kriterien Interferenz, Abhängigkeit vom Genotyp des Wirtes und serologische Eigenschaften, wurden inzwischen noch weitere Untergruppen (C und D) gefunden (17,36).

C. Problemstellung

Tumorviren bieten gegenüber chemischen oder physikalischen Cancerogenen für das Studium der Onkogenese den Vorteil, daß bei ihnen dieser Prozeß von der genetischen Information der Virusteilchen bestimmt wird. Eine Analyse der Wirkung und Regulation virusspezifischer Genfunktionen ist daher ein erfolgversprechender Weg, um den Mechanismus der Onkogenese zu enträtseln. Über die Genetik von HLS-Viren ist im Vergleich zu DNS-haltigen Tumorviren und Myxoviren noch sehr wenig bekannt. Untersuchungen in dieser Richtung sind deshalb so erschwert, weil bisher weder Mutanten noch Rekombinanten nachgewiesen werden konnten. Dies liegt zum Teil sicher darin begründet, daß das experimentelle System relativ schwer zu handhaben ist. Die wichtigste Voraussetzung für jede

genetische Untersuchung sind Hühner, die nicht latent mit HL-Viren infiziert sind. Derartige Hühner waren bis vor kurzem kaum verfügbar. Umständliche Infektiositätsteste, niedere Infektiositätstiter, Instabilität und - wahrscheinlich durch Wirtszellkomponenten bedingte - schlechte Antigenität dieser Viren (12,98) erschweren ebenfalls viele Versuche. Zum anderen scheinen HLS-Viren im Gegensatz zu dem morphologisch ähnlichen Influenzavirus wenig rekombinationsfreudig zu sein (86,102).

Trotz der erwähnten Schwierigkeiten gibt es Gründe, die es rechtfertigen, die HLS-Viren den DNS-haltigen Tumorviren als Modelle für das Studium der Virusonkogenese vorzuziehen. Das Verhältnis von onkogenen zu infektiösen Teilchen ist z.B. beim RSV gleich 1 (48), bei dem am besten transformierenden DNS-Tumorvirus, dem SV40, nur ca. 10^{-6} (33). Die Zellen einer Hühnerfibroblastenkultur lassen sich mit RSV nahezu ausnahmslos transformieren (9) und produzieren infektiöses Virus. Trotzdem ist es möglich, mit ihnen die Onkogenese auch unter Bedingungen zu studieren, bei denen analog zu den mit DNS-Tumorviren transformierten Zellen kein infektiöses Virus produziert wird (s.S.93). Die Ausnutzung der Phänomene Interferenz und genetische Resistenz ermöglicht schließlich bei den HLS-Viren die Untersuchung einiger spezieller Probleme, die die Wechselwirkungen zwischen Virus und Zellrezeptoren betreffen.

Eine der interessantesten Fragen, die bei der Untersuchung der Virusonkogenese gestellt werden können, lautet: Wird für die Transformation einer Zelle das gesamte Virusgenom oder nur ein Teil desselben benötigt?

Eine Klärung dieses Problems würde der Analyse der der Onkogenese zugrunde liegenden Prozesse einen entscheidenden Schritt näher bringen. Überzeugende Ergebnisse in dieser Richtung wurden bisher bei gewissen DNS-, nicht aber bei den RNS-Tumorviren erzielt.

Bei den entsprechenden Untersuchungen bedient man sich im allgemeinen der Methode der differentiellen Inaktivierung verschiedener Virusgenfunktionen. Durch Behandlung mit einem inaktivierenden bzw. mutagenen Agens verändert man die Nucleinsäure des Virus. Aus der Bestimmung der noch verbleibenden biologischen Aktivitäten kann dann auf die relativen Treffbereiche der untersuchten Genfunktionen geschlossen werden (57). Mit Hilfe dieser Technik wurde für das Polyomavirus gezeigt, daß der Treffbereich für die Onkogenität 20 - 60 % dem der Fähigkeit zur Bildung infektiöser Nachkommenschaft entspricht (10,19,46,56). Ein ähnlicher Befund wurde bei zwei weiteren DNS-haltigen Tumorviren, dem SV40 (32,33) und einem Adenovirus, erhoben (26).

Beim RSV erschien bisher nur eine Mitteilung, die sich mit dem entsprechenden Problem befaßte (49). Nach Einwirkung von γ-Strahlen auf das RSV fanden Goldé und Latarjet Virusteilchen, die Hühnerzellen transformierten, ohne daß in diesen die Neusynthese von Virus nachweisbar war. Sie schlossen daraus, daß der Treffbereich für die Onkogenität hier ebenso wie bei den DNS-Tumorviren kleiner ist als derjenige für die Infektiosität. Da die genannten Autoren zur Bestimmung der Onkogenität und Infektiosität von RSV mit einem schlecht definierten System arbeiteten, schien es angebracht, dieser

Frage bei den HLS-Viren noch einmal nachzugehen. Der in vorliegender Arbeit angewendete Focus-Test erlaubte, mit genau charakterisierten und für e i n Experiment einheitlichen Zellen zu arbeiten. Außer der Onkogenität und Infektiosität wurden noch zwei weitere Virusgenfunktionen verfolgt, nämlich die Fähigkeiten, gs- und V-Antigen zu bilden.

Um die Onkogenität zu untersuchen, wurde mit einem in vitro transformierenden HS-Virus, dem RSV, gearbeitet. Für das Studium weiterer Virusgenfunktionen ist dieses Virus weniger gut geeignet, da die von ihm in vitro erreichte Konzentration zum quantitativen Nachweis seiner Strukturkomponenten nicht ausreicht. Außerdem läßt sich mit dem RSV, gerade weil es in vitro transformiert, das V-Antigen nicht im Interferenztest bestimmen. Diese Voraussetzungen werden aber von dem zu den HL-Viren gehörenden BAI-A Stamm der Hühnermyeloblastose erfüllt. Er vermehrt sich gut in Hühnerfibroblasten, ohne sie zu transformieren. Dieses Virus wurde für die Untersuchung aller virusspezifischen Genfunktionen außer der Onkogenität herangezogen. Da sich die beiden erwähnten Viren in allen übrigen Eigenschaften, wie der Morphologie, dem physikalisch-chemischen Verhalten, dem Gehalt an gs- und V-Antigen und dem Vermehrungsmechanismus, (98) weitgehend gleichen, erschien es berechtigt, die bei dem einen gewonnenen Erkenntnisse auf das andere zu übertragen.

Als inaktivierendes Agens wurde zunächst Hydroxylamin (HA) verwendet. Aus Versuchen mit dem Tabak-Mosaik-Virus war bekannt, daß HA für RNS-Viren mutagen ist (84).

Scholtissek und Rott gelang es, mit HA verschiedene Genfunktionen des ebenfalls RNS-haltigen Influenzavirus unterschiedlich zu inaktivieren (82). Schuster zeigte, daß die Inaktivierung der RNS durch HA auf einer Reaktion mit den Pyrimidin-Basen beruht. Bei pH 6,15 reagiert das Cytosin mehr als 30mal schneller als das Uracil, bei pH 9,15 dagegen das Uracil ca. 8mal schneller als das Cytosin. Das Cytosin wird dabei zu einer Uracil-ähnlichen Form verändert, während das Uracil herausgespalten wird (83). Die Transition von Cytosin zu Uracil entspricht wahrscheinlich dem mutagenen, die Zerstörung des Uracils dem inaktivierenden Effekt des HA (84).

Aus Arbeiten von Freese u. Mitarb. ist bekannt, daß bei niedrigen HA-Molaritäten Peroxyde entstehen, die auf indirektem Wege zur Inaktivierung des gesamten Genoms führen können (43). Um derartige Effekte zu vermeiden, wurde eine relativ hohe Molarität ausgewählt (1 M).

Da es mit Hilfe des HA nicht gelang, eine differentielle Inaktivierung der Onkogenität und Infektiosität nachzuweisen, wurden in späteren Versuchen auch Bestrahlungsmethoden angewendet.

II. MATERIAL

A. Virusstämme

Modellviren für die differentielle Inaktivierung

Den BAI-A Stamm (bureau of animal industry strain A) des Myeloblastose-Virus (avian myeloblastosis virus, AMV) erhielten wir ursprünglich von Dr. J.W. Beard, Durham, USA. Dieser Virusstamm wird seit 1963 in unserem Institut im Huhn passagiert und besteht vorwiegend aus einem Gemisch von Viren der Untergruppen A und B (63).

Als RSV-Vertreter wurde der Schmidt-Ruppin-Stamm SR-RSV-1 verwendet. Er wurde uns von Dr. P.K. Vogt, Seattle, USA, überlassen und gehört zur Untergruppe A (103).

Referenzviren zur Prüfung der Zellkulturen

Um festzustellen, welchem Typ die jeweils verwendeten Hühnerfibroblasten angehörten, wurden folgende Virus-Referenz-Stämme benutzt:

BH-RSV (RAV-1)	als Vertreter der Untergruppe A,
BH-RSV (RAV-2)	als Vertreter der Untergruppe B,
B-77	als Vertreter der Untergruppe C und
SR-RSV-H	als Vertreter der Untergruppe D.

Die A- und B-Stämme erhielten wir von Dr. P. Biggs, Houghton, Huntingdon, England, und den C-Stamm von Dr. P.K. Vogt, Seattle, USA. Der D-Stamm wurde in unserem Institut isoliert (17).

B. Hühner

Zum Anlegen von Zellkulturen wurden Embryonen zweier Hühnerherden verwendet. Die Linie 15 (L-15) wird seit 1963 in unserem Institut gezüchtet. Sie stammt von Dr. B.R. Burmester, East Lansing, USA. Diese Hühner liefern Zellen der Typen C/A und C/O. Die zweite Herde - Spafas - stammt von Dr. R. Luginbuhl, Storrs, Connecticut, USA, und wird von der Firma Lohmann, Cuxhaven, gehalten. Der Zelltyp dieser Herde ist überwiegend C/O, selten C/B. Beide Hühnerherden sind nach routinemäßig durchgeführten Testen frei von einer latenten Infektion mit HLS-Viren (s.S. 20).

C. Nährmedien

Als Nährlösung für die Hühnerfibroblastenkulturen wurde das von Eagle (38) beschriebene Medium verwendet. Es hat folgende grundlegende Zusammensetzung:

Aminosäuregemisch
Vitamingemisch
Glucose und Glutamin
Salzgemisch
Phenolrot (als Indikator)
Penicillin und Streptomycin

Diese Substanzen wurden gemischt und in Wasser gelöst. Nach Filtration durch bakteriendichte Filter wurde die Lösung in Portionen von 500 ml in Flaschen abgefüllt und der pH-Wert durch Begasung mit CO_2 auf 7,5 eingestellt. Von der ersten und letzten Flasche wurden Proben entnommen, die wir in Nährbouillon auf Sterilität prüften. Das fertige Medium wurde durchschnittlich

1 - 3 Wochen bei 4° C gelagert. Kurz vor der Verwendung wurde Kalbserum (2 - 8 %) zugegeben.

Das Agar-haltige Medium (Agar-"Overlay") zur Überschichtung der Focus-Testkulturen enthielt Medium 199. Im Vergleich zum Medium nach Eagle hat es einen geringeren Gehalt an Aminosäuren. Es wurde in zehnfach konzentrierter, flüssiger Form von Microbiological Associates, Bethesda, Md., USA, bezogen. Die Zusammensetzung des verwendeten Agar-Overlays war im wesentlichen die gleiche wie die von Temin und Rubin (94) angegebene:

zweifach konzentriertes Medium 199	- 41,5 %
Tryptosephosphat	- 10 %
Kalbserum	- 5 %
2,8 %iges Natriumbicarbonat	- 2 %
1,8 % Agar	- 41,5 %

Die Agar-Lösung (Bacto, Difco) wurde in 200 ml-Portionen abgefüllt und 20 Minuten bei 120° C autoklaviert. Das Tryptosephosphat (Difco, Detroit, Michigan, USA) wurde in Wasser eingewogen, 20 Minuten bei 120° C autoklaviert und bei 4° C gelagert. Das Kalbserum wurde von der Firma Bayer AG., Leverkusen, zur Verfügung gestellt.

D. Lösungen

Als Verdünnungspuffer für Viren und Zellen hat sich ein Phosphatpuffer mit einem Zusatz von 10 % Kalbserum als besonders geeignet erwiesen. Der reine Phosphatpuffer (P-Puffer) hatte ein pH von 7,2 und enthielt

0,125 M NaCl
0,005 M KH_2PO_4
0,015 M $Na_2HPO_4.2H_2O$

Der außerdem verwendete Tris-Puffer besteht aus

0,01 M Tris (hydroxymethyl)aminomethan
0,1 M NaCl
0,001 M Äthylendiaminotetraessigsäure

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,4 eingestellt.

Veronalpuffer:

Nach der Vorschrift von Osler et al. (67) wurde auf der Basis von Diäthylbarbiturat eine Stammlösung mit einem pH-Wert von 7,2 - 7,4 hergestellt. Sie wurde zum Gebrauch 1 : 5 verdünnt und bei 4^{o} C aufbewahrt.

Trypsinlösung:

Das Trypsin wurde von der Firma Nutritional Biochemicals, Cleveland, Ohio, USA, bezogen. Die 0,25 %ige Stammlösung (pH 7,5) wurde zum Gebrauch mit P-Puffer 1 : 5 verdünnt. Die Lösungen wurden bei 4^{o} C gelagert.

Adenosintriphosphatase (ATPase) Reagens:

Das Adenosintriphosphat (ATP) wurde von der Firma Papst Laboratory, Milwaukee, Wisconsin, USA, bezogen.

Zur Herstellung der Stammlösung wurden nach der Vorschrift von Mommaerts et al. (62) 20 ml 0,5 M NaCl + 4 ml einer 0,014 %igen Phenolrotlösung auf 120 ml mit Wasser aufgefüllt. Unter Rühren wurden hierzu 600 mg ATP sowie 16 ml 0,5 M $MgCl_2$-Lösung zugegeben und das Gemisch mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Schließlich wurde 1,6 ml

0,06 M $NaHCO_3$-Lösung zugefügt und mit NaOH ein pH von 7,5 eingestellt. Die mit Wasser auf 200 ml aufgefüllte Lösung wurde in 10 ml-Portionen bei -20° C aufbewahrt.

Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

E. Herkunft weiterer Chemikalien

Hydroxylammoniumchlorid, p.A.	: Merck AG., Darmstadt
Cytosin Arabinosid und Desoxycytidin	: Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA
^{14}C-Leucin	: New England Nuclear, Boston, Mass., USA
Natriumlaurylsulfat	: Th. Schuchardt, München
D(+)-Saccharose, reinst	: Merck AG., Darmstadt

III. METHODEN

A. Züchtung von Zellkulturen

Primäre Hühnerfibroblasten

Das Anlegen von Primärkulturen erfolgte nach einem modifizierten Verfahren von Dulbecco (37). Aus dem 11 Tage bei 38° C bebrüteten Hühnerei wurde der Embryo entnommen und Kopf, Beine und Eingeweide entfernt. Der Embryorest wurde dann 2mal mit P-Puffer gewaschen, mit Pinzetten zerkleinert und in 20 ml einer 0,25 %igen Trypsin-Lösung aufgenommen. Nach 20 Minuten langem Rühren bei 20° C wurden die Zellen zur Entfernung von größeren Gewebeteilchen durch eine doppelte Lage von Gaze in ein im Eisbad gekühltes Zentrifugenröhrchen filtriert. Die Prozedur wurde ein zweites Mal wiederholt und anschliessend die zellhaltige Trypsin-Lösung 5 Minuten lang bei 2000 UpM zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 20 ml Medium suspendiert, die Zellzahl ermittelt und die Zellen schließlich für jeden Embryo getrennt in Kunststoff-Petrischalen ausgesät. Zur Prüfung der Zellen auf Virusresistenz wurden je Embryo 4 kleine Petrischalen (Ø 5 cm) mit $1{,}25 \times 10^6$ Zellen angelegt (s.S. 19). Für die eigentlichen Versuche wurden große Petrischalen (Ø 8,6 cm) mit 6 bis 8×10^6 Zellen beschickt und 5 - 9 Tage später davon Sekundärkulturen angelegt. Die Kulturen wurden bei 38° C in einem CO_2-begasten Brutschrank gehalten.

Passagieren der Hühnerfibroblasten

Nach Absaugen des Nährmediums von den Kulturen wurde der Zellrasen mit 2 ml (pro kleine Schale) bzw. 3 ml (pro große Schale) einer 0,05 %igen Trypsin-Lösung 10 Minuten lang bei 38° C inkubiert. Danach wurden die aus dem Verband gelösten Zellen suspendiert und entweder in ein Sammelgefäß oder auf einzelne Röhrchen übertragen. Nach Ermittlung der Zellzahl wurden 2 bis 2,5 x 10^6 Zellen/ große Schale und 1 bis 1,25 x 10^6/kleine Schale ausgesät.

B. Prüfung der Hühnerfibroblasten auf Virusresistenz

Prüfung auf genetische Resistenz

Von jedem Embryo wurde je eine Primärkultur (kleine Schale) mit ca. 1000 Focus-bildenden Einheiten (FBE) von BH-RSV (RAV-1), BH-RSV (RAV-2), B-77 bzw. SR-RSV-H beimpft; eine 4. Schale diente als unbeimpfte Kontrolle. Die Kulturen wurden dann wie die Ansätze für den Focus-Test (s.S. 28) behandelt und nach 5 Tagen die entstandenen Foci ausgezählt. Aus der Resistenz gegen das zur Subgruppe A gehörende BH-RSV (RAV-1) bzw. das zur Subgruppe B gehörende BH-RSV (RAV-2) wurde der Zelltyp ermittelt. Ist ein Embryo gegen keines der beiden Viren resistent, wird er wie vorher erwähnt als C/O, ist er gegen das A- oder das B-Virus resistent, als C/A bzw. C/B bezeichnet (103). Das B-77-Virus und das SR-RSV-H wurden als positive Kontrollen verwendet, da sie auf allen drei Zelltypen Foci bilden können (17). Die resistenten Zellkulturen waren mehr als 10 000mal

weniger empfänglich für das entsprechende Referenzvirus als die nicht resistenten Kulturen.

Prüfung auf latente Virusinfektion

Die Kulturflüssigkeiten von 2 - 3 großen Kulturen wurden durch fraktioniertes Zentrifugieren konzentriert (s.S. 33). Das Sediment wurde in 0,7 ml Veronalpuffer gelöst und mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion (KBR) auf das Vorhandensein von Virus geprüft (16). In zweifelhaften Fällen wurde die Kulturflüssigkeit auf virusfreie C/O-Kulturen übertragen und nach zweimaligem Passagieren der Zellen das durch Zentrifugieren des Kulturmediums erhaltene Konzentrat in der Komplementbindungsreaktion oder im Interferenzversuch auf das Vorhandensein eines Virus getestet.

C. Bestimmung virusspezifischer biologischer Aktivitäten

Von den virusspezifischen biologischen Aktivitäten wurden, wie schon erwähnt, neben der Infektiosität und Onkogenität das gs- und V-Antigen erfaßt. Die Infektiosität wird definiert als die Eigenschaft des Virus, die Bildung vermehrungsfähiger Nachkommen in der Wirtszelle zu induzieren; die Onkogenität ist seine Eigenschaft, Zellen morphologisch zu transformieren. Vom Wildtyp des RSV ist bekannt, daß jedes für Hühnerzellen onkogene Virusteilchen in diesen auch die Produktion von infektiöser Nachkommenschaft veranlaßt. Die Bestimmung der Infektiosität und Onkogenität erfolgt deshalb beim RSV mit der gleichen

Methode, dem Nachweis der transformierten Zellherde im Focus-Test.

1. Gruppenspezifisches (gs) Antigen

Durch Injektion von degradiertem AMV und partiell gereinigtem gs-Antigen in Kaninchen erhält man komplementbindende Seren, die nach Absättigung mit normalem Hühnerzellantigen virusgruppenspezifisch reagieren (14,40). Derartige Seren wurden freundlicherweise von Dr. H. Bauer zur Verfügung gestellt. Für die KBR wurde die Mikromethode nach Fulton und Dumbell in modifizierter Form angewendet (45). Bei einer konstanten Serumkonzentration (4 - 8 komplementbindende (KB) Einheiten) wurden das Antigen in 2er-Schritten und das Komplement in 1,3er-Schritten in Veronalpuffer verdünnt. Als positiv galt die Antigenverdünnung, bei der 1,5mal mehr Komplement verbraucht wurde, als bei der Kontrolle ohne Serum.

Da das gs-Antigen eine Virusstrukturkomponente ist, kann man durch die Bestimmung des Komplementbindungstiters einer Viruslösung auch deren Gehalt an Viruspartikeln annähernd abschätzen. Eine KB-Einheit entspricht etwa 10^6 infektiösen und 10^9 nichtinfektiösen Virusteilchen (13).

2. V-Antigen

Eine mit einem HLS-Virus vorinfizierte Zelle wird, wie bereits erwähnt, gegen die Nachinfektion mit einem Virus der gleichen Untergruppe resistent (104). Dies

kann durch die Blockierung der für die Penetration wichtigen Zellrezeptoren durch das V-Antigen erklärt werden (88). Steck und Rubin verfolgten das Ausmaß der Interferenz gegenüber einem als Indikatorvirus verwendeten Focus-bildenden RSV in Abhängigkeit von der Zeit nach der Infektion (87). Zu verschiedenen Zeiten nach Infektion mit dem auszutestenden nichttransformierenden Virus wurde mit RSV überinfiziert und das Ausmaß der Hemmung der Focus-Bildung bestimmt. In den ersten Stunden fand sich eine starke Interferenz, die danach ab- und erst ca. 2 - 3 Tage später wieder zunahm. Dieser Befund spiegelt die Verhältnisse bei einer Virusinfektion mit animalen Viren wieder. Zwischen Adsorption und Penetration einerseits und der Produktion neuer Teilchen andererseits liegt eine Eklipsphase, während der kein infektiöses Virus nachweisbar ist. Die "frühe" Interferenz wird durch das infizierende, die "späte" Interferenz durch das neugebildete Virus verursacht.

Aufgrund der Ergebnisse von Steck und Rubin läßt sich der V-Antigengehalt einer AMV-Probe durch die "frühe" Interferenz bestimmen. Die Technik hierfür wird im Folgenden beschrieben.

Kleine Fibroblastenkulturen wurden nach Absaugen des Mediums 2mal mit P-Puffer gewaschen, mit 0,5 ml AMV-Verdünnung beimpft und 60 Minuten bei 38° C inkubiert. Anschließend wurde nochmals mit P-Puffer gewaschen und die Kulturen mit einer geeigneten Verdünnung von RSV beimpft. Nach weiterem 60 Minuten langem Inkubieren wurden sie mit Agar-Overlay überschichtet.

Als Maß für die "frühe Interferenz" gilt folgender Quotient: Anzahl der Foci in der nicht vorinfizierten Kontrolle/Anzahl der Foci in der vorinfizierten Kultur.

In einem Vorversuch wurde geprüft, ob eine lineare Abhängigkeit zwischen der Menge des auszutestenden Virus (AMV) und dem Ausmaß der frühen Interferenz besteht. Dabei wurden AMV-Proben in 0,5 $\log_{10}$ Schritten verdünnt und mit jeder Verdünnung mehrere Platten beimpft. Diese wurden, zusammen mit Kontrollplatten, 60 Minuten später mit verschiedenen Konzentrationen von BH-RSV (RAV-1) überinfiziert. Durch Auszählung der entstandenen Foci wurde schließlich das Ausmaß der frühen Interferenz ermittelt. Es wurden 2 Versuche dieser Art durchgeführt.

Aus dem in Abb. 2 wiedergegebenen Ergebnis ist zu ersehen, daß die erwartete lineare Abhängigkeit besteht. Die unterschiedliche Lage der beiden Geraden deutet darauf hin, daß in der ersten Virusprobe mehr interferierendes Material bzw. V-Antigen des dem Indikatorvirus entsprechenden Typs (A) enthalten war als in der 2. Probe. Durch Überinfektion mit einem RSV des Typs B läßt sich in gleicher Weise der Gehalt an B-Virus in dem beide Virustypen enthaltenden AMV-Material (s.S. 13) ermitteln.

3. Infektiosität des AMV

Endpunkttitration

Bei dieser Methode werden die Virusproben über den mutmaßlichen Infektiositätstiter hinaus verdünnt und Zell-

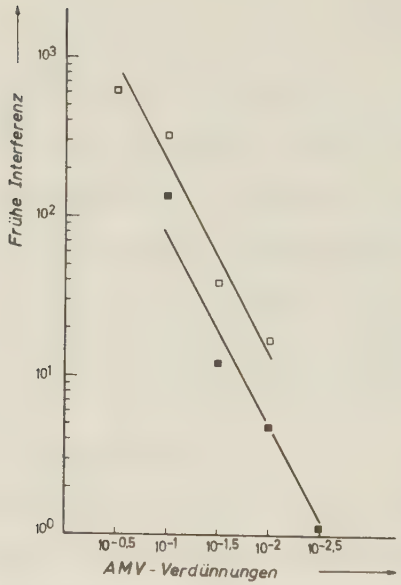

Abb. 2: Abhängigkeit der frühen Interferenz von der Virusdosis (AMV). Indikatorvirus: BH-RSV (RAV-1).

□ Probe 1
■ Probe 2

kulturen mit den verschiedenen Virusverdünnungen beimpft. Die einzelnen Kulturen werden später mit Hilfe der KBR auf das Vorhandensein von Virus geprüft (16,79). Als Titer wird die negative Zahl derjenigen Verdünnung angegeben, bei der noch 50 % der beimpften Kulturen positiv reagierten (ID_{50}).

Zur Infektion wurden kleine Schalen mit 10^6 Hühnerfibroblasten 3mal mit P-Puffer gewaschen, mit 0,2 ml einer AMV-Probe beimpft, 45 Minuten bei 38° C inkubiert, nochmals gewaschen und schließlich mit 5 ml frischem Medium weiter bebrütet. Im Abstand von ca. 4 Tagen wurden die zu dichten Zellrasen ausgewachsenen Zellen 2mal passagiert, wobei jedesmal große Schalen mit 2×10^6 Zellen beimpft wurden. Die Kulturpassage war notwendig, da, wie bereits in der Einleitung erwähnt, nur sich teilende Zellen von dem Virus infiziert werden. 5 Tage nach der letzten Passage wurden die Kulturflüssigkeiten geerntet und das Virus durch fraktioniertes Zentrifugieren angereichert. Die im P-Puffer gelösten Sedimente wurden in der KBR auf ihren Virusgehalt geprüft.

Im allgemeinen wurden bei einer Titration 3 Schalen/Verdünnung angesetzt. Die ID_{50} wurde nach einer Formel von Spermann-Kärber (59) berechnet und der mittlere Fehler nach einem Diagramm von Lorenz (58) abgeschätzt.

Vergleichender Interferenzversuch

Der vergleichende Interferenzversuch ist im Vergleich zur Endpunkttitration bei gleicher Anzahl von Schalen eine genauere Methode zur Bestimmung der Infektiosität

nichttransformierender Viren. Hierbei werden die Kulturen drei Tage nach Infektion mit dem auszutestenden HL-Virus passagiert und 1 Tag später durch Überinfektion mit RSV das Ausmaß der "späten" Interferenz (s. Abb. 11) bestimmt (106). Durch Verwendung entsprechender RSV-Stämme kann zwischen der Infektiosität des im AMV-Material enthaltenen A- und B-Virus unterschieden werden (s.S. 13). Im Gegensatz zur Endpunkttitrationsmethode erhält man mit dieser Methode relative Infektiositätstiter.

In einem Vorversuch wurde die Infektiosität des A-Virus von 3 verschiedenen AMV-Proben verglichen. Kleine Schalen wurden mit 10^6 Hühnerfibroblasten beschickt und mit verschiedenen Verdünnungen ($\log_{10}$) vorinfiziert. 3 Tage später wurden die Zellen auf je 3 kleine Schalen übertragen. Am darauffolgenden Tage wurden die Kulturen mit 0,2 ml verschiedener BH-RSV (RAV-1)-Konzentrationen überinfiziert, zur Adsorption 45 Minuten bei 38° C inkubiert und anschließend mit Agar-Overlay überschichtet. Das Verhältnis der Anzahl der Foci auf vorinfizierten zur Anzahl der Foci auf nicht vorinfizierten Kulturen wurde ermittelt und entspricht der relativen Empfänglichkeit der Zellen.

Aus dem in Abb. 3 graphisch dargestellten Ergebnis ist zu ersehen, daß im Einklang mit Befunden anderer Autoren die Interferenz bzw. relative Empfänglichkeit der Zellen den AMV-Verdünnungen proportional ist (106). Aus einem Vergleich der Abstände zwischen den Geraden ergeben sich die relativen Infektiositätstiter. Danach ist in der 1. Virusprobe ca. 1,9 bzw. 3,3 log mehr infektiöses A-Virus enthalten als in der 2. bzw. 3. Probe.

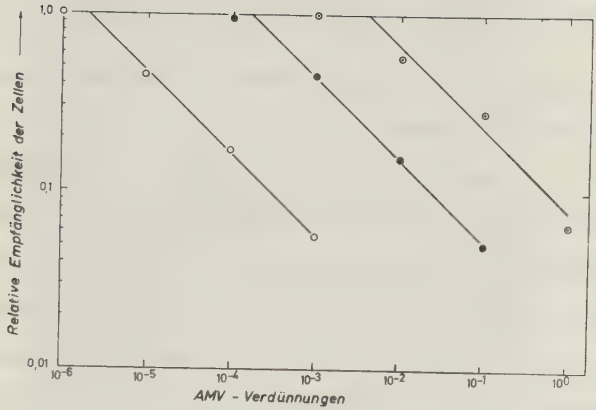

Abb. 3: Bestimmung der relativen Infektiosität von 3 AMV-Proben im vergleichenden Interferenzversuch.
Indikatorvirus: BH-RSV (RAV-1).

o Probe 1
● Probe 2
⊙ Probe 3

4. Onkogenität und Infektiosität des RSV

Der zur Bestimmung der Onkogenität und Infektiosität des RSV verwendete Focus-Test wurde im wesentlichen nach einer von Temin und Rubin beschriebenen Methode durchgeführt (94). 18 - 24 Stunden nach Infektion wurden die Kulturen mit 5 ml Agar-Overlay überschichtet und anschließend unter den üblichen Bedingungen in einem Brutschrank bei hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert.

7 - 10 Tage nach Infektion wurden die Foci makroskopisch oder mit Hilfe eines Zeiss-Plankton-Mikroskops ausgezählt. Die Dosiswirkungskurve verlief im allgemeinen linear. Da die Foci der verwendeten Stämme unterschiedlich groß sind, ließen sich für BH-RSV bis zu 350, für SR-RSV aber nur bis zu 150 Foci/Schale gut auswerten (Abb. 4). Die Onkogenität bzw. Infektiosität wird in Focus-bildenden Einheiten/ml (FBE/ml) angegeben.

D. Abschätzung der AMV-Konzentration im ATPase-Test

In Myeloblasten gebildetes AMV enthält neben anderen zellspezifischen Bestandteilen ATPase (62). Die Menge der im Blutplasma nachweisbaren ATPase ist unter Standardbedingungen der Viruskonzentration etwa proportional.

Die Bestimmung der ATPase erfolgte nach der von Mommaerts et al. beschriebenen Methode (62). Zu 1 ml ATPase Reagens wurde 0,01 ml virushaltiges Hühnerplasma gegeben. Der Zeitintervall bis zum Umschlag zum sauren

Abb. 4: a) Foci von SR-RSV-1.
Färbung mit Carbolfuchsinlösung (1 : 100)
3fache Vergrößerung.
b) Foci von BH-RSV (RAV-1).
Färbung mit Carbolfuchsinlösung (1 : 100)
3fache Vergrößerung.
c) Ungefärbter Focus von BH-RSV (RAV-1).
30fache Vergrößerung.

pH-Wert ist ein Maß für die Menge der vorhandenen ATPase. Eine Viruskonzentration von ca. 10^9 $ID_{50/ml}$ entspricht einer Reaktionszeit von 2 Minuten.

E. Produktion von Virus

1. In vivo

Zur Vermehrung von AMV wurden 1 Tag alte Küken mit je ca. 10^7 ID_{50} intraperitoneal infiziert. 2 - 4 Wochen später erkrankten 20 - 50 % der Küken an Myeloblastose. Das Blut der moribunden Tiere wurde durch Herzpunktion gewonnen und zur Vermeidung der Gerinnung in 3,7 %iger Natrium-Citrat-Lösung aufgenommen. Nach Abschleudern der im Blut enthaltenen Zellen (10 Minuten langes Zentrifugieren bei 3000 UpM) wurde die Menge des Virus im Plasma mittels des ATPase-Testes abgeschätzt. Die virushaltigen (bis zu 10^{10} $ID_{50/ml}$) Blutplasmen wurden in 1 bis 4 ml Portionen bei -70° C eingefroren.

2. In vitro

In Petrischalen

Zur Produktion kleinerer Virusmengen wurden Zellkulturen in Petrischalen angelegt und mit dem betreffenden Virus infiziert. B-Viren wurden auf C/A- und A-Viren auf C/B-Zellen vermehrt. Nach der Ernte wurden die in den Kulturflüssigkeiten enthaltenen Zellbestandteile durch 10 Minuten langes Zentrifugieren bei 3000 UpM entfernt und der Überstand in kleinen Portionen bei -70° C eingefroren.

In "Roller"-Flaschenkulturen

Zur Gewinnung größerer Mengen von SR-RSV-1 wurden "Roller"-Flaschenkulturen verwendet. Hierzu wurden 2-Liter-Flaschen mit je 50 ml Nährmedium + 4 % Kalbserum beschickt und in ein vertikal stehendes, rotierendes Rad eingespannt (55). Der pH-Wert von ca. 7,2 wurde durch Begasung mit CO_2 eingestellt. Jede Flasche wurde mit 10^7 RSV-transformierten Zellen beimpft und die Drehzahl des Rades zunächst niedrig gehalten (ca. 1/10 UpM). Nach einem Tag waren die Zellen angewachsen. Nunmehr wurde die Geschwindigkeit erhöht (ca. 1/2 UpM). 3 - 5 Tage später waren die Wände der Flaschen dicht mit Zellen bewachsen. Die Ernte des virushaltigen Mediums erfolgte von da ab im Abstand von einem Tag über einen Zeitraum von 2 Wochen.

F. Behandlung von Virus mit inaktivierenden Agenzien

Hydroxylamin (HA)

In P-Puffer wurde eine 2 molare HA-Lösung hergestellt. Den gewünschten pH-Wert stellten wir mit NaOH ein. Das Virus wurde auf verschiedene Röhrchen verteilt und, wenn nicht anders vermerkt, bei 20° C in einem Wasserbad (Ultrathermostat der Firma Colora) inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden die Proben mit einem gleichen Volumen HA-Lösung gemischt. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Röhrchen in ein Eisbad überführt wurden. Anschließend wurde gegen 5 l vorgekühlten P-Puffer bei 4° C dialysiert. Durch Anwendung einer Mikromethode zur Bestimmung des HA (42) wurde ermittelt, daß nach 5maligem

Pufferwechsel (viermal im Abstand von 1 Stunde, einmal über Nacht) kein HA mehr im Puffer nachzuweisen ist. (Nachweisbarkeitsgrenze: 10^{-5} bis 10^{-6} M).

Röntgenstrahlen

Es wurde mit einem Müller RT100 Röntgengerät bei 100 KV und 8 mA gearbeitet. 2 ml Viruslösung wurden in einer kleinen Kunststoff-Petrischale bei Zimmertemperatur bei 2 cm Abstand von der Strahlenquelle ohne Verwendung eines Filters bestrahlt. Die Tiefe der Flüssigkeitsschicht betrug 0,87 mm. Die Strahlung entsprach ca. 40 000 Röntgen/Min. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und getestet.

Ultraviolett (UV) Strahlen

2 ml Viruslösung wurden in einer großen Kunststoff-Petrischale bei Zimmertemperatur unter ständigem leichtem Schütteln bestrahlt und zu verschiedenen Zeiten 0,1 ml Proben entnommen. Die Tiefe der Flüssigkeitsschicht betrug etwa 0,34 mm. Die Lichtquelle (Niederdruckbrenner NK20/40 der Quarzlampengesellschaft Hanau) war in einem Abstand von 32 cm von der Flüssigkeitsoberfläche angeordnet. Die eingestrahlte Energie betrug ca. 13 Erg/mm^2/Sek.

G. Biophysikalische Untersuchungsmethoden

1. Zentrifugation

Fraktionierte Zentrifugation

Durch fraktionierte Zentrifugation wurde das Virus konzentriert und grob gereinigt. Die virushaltige Gewebekulturflüssigkeit wurde dabei, um gröbere Bestandteile zu entfernen, zunächst 10 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert und darauf das Virus aus ihr 60 Minuten bei einem performance index (pi) von 10 (47) in einer präparativen Ultrazentrifuge der Firma Beckman ausgeschleudert. Nach einer derartigen Zentrifugation werden annähernd 100 % der Virusteilchen sedimentiert. Nach Dekantieren des Überstandes lösten wir die Sedimente in 0,5 - 2,0 ml KS-Puffer. Wenn höher gereinigtes Material benötigt wurde, schloß sich noch eine Zentrifugation im Zuckergradienten an.

Zentrifugation im Zuckergradienten

Für dieses Verfahren wurden durchsichtige Cellulose-Röhrchen verwendet. Das Zentrifugieren erfolgte in Schwingrotoren der präparativen Beckman Zentrifuge. Das zu reinigende Virusmaterial wurde auf einen präformierten Zuckergradienten aufgelegt. Die einzelnen Fraktionen wurden nach dem Zentrifugieren durch ein Loch am Boden des Röhrchens entnommen. Den Zucker entfernten wir durch Dialyse gegen P-Puffer.

2. Zählung der Zellen

Die Zellen wurden in einem Modell A Gerät der Firma Coulter Electronics Ltd., Dunstable, Bds., Englang, gezählt. Das Gerät wurde so eingestellt, daß alle Teilchen, die weniger als das halbe Volumen von Hühnerfibroblasten haben, nicht erfaßt wurden.

3. Bestimmung der Radioaktivität

Das durch Einbau von Isotopen markierte Virusmaterial wurde unter Zugabe eines Tropfens 2 %iger Hefe-RNS als Trägersubstanz mit 4 %iger Trichloressigsäure auf Nitrocellulose-Filter (Sartorius Membranfilter) präzipitiert. Nach Trocknung (10 Minuten bei 100° C) wurden diese in Röhrchen mit Toluol-Szintillationsflüssigkeit (0,3 g 1,4 bis -2-(4 Methyl-5-Phenyloxazolyl)Benzol und 5 g 2,5-Diphenyloxyzol in 1 l Toluol) gegeben und die Radioaktivitäten in einem Packard Tri-Carb Szintillationszähler gemessen.

4. Elektronenmikroskopie

Für die Untersuchungen wurde das Elmiskop Ia der Firma Siemens benutzt.

Die Kontrastierung der Präparate mit Phosphorwolframsäure erfolgte im Prinzip nach einem Verfahren von Brenner und Horne (21). Dabei wurde ein Tropfen des zu untersuchenden Materials auf einen mit einer Formvar-Kohleschicht bedeckten Objektträger aufgetragen. 30 Sekunden später entfernten wir die noch nicht einge-

trocknete Flüssigkeit mit einem Filterpapier und setzten 1 Tropfen einer 0,2 %igen Phosphorwolfram-Lösung zu. Diese wurde schließlich nach 30 Sekunden langer Einwirkungsdauer abgesaugt.

Bei der Agar-Filtration bedienten wir uns der von Kellenberger und Arber angegebenen Methode (54).

IV. ERGEBNISSE

Die zu beschreibenden Versuche verliefen im Prinzip wie folgt: Zunächst wurde in Vorversuchen die Wirkung des HA auf die Onkogenität bzw. Infektiosität und auf die Virusstrukturbestandteile untersucht. Dann wurden Bedingungen ausgearbeitet, bei denen sich unter Ausschluß von Sekundärinfektionen, die eine Analyse der Behandlungseffekte erschweren würden, eine ausreichend hohe Ausbeute virusspezifischer Produkte in der Gewebekultur erzielen läßt. In den Hauptversuchen wurden die Inaktivierungskinetiken verschiedener Genfunktionen des AMV und des RSV nach HA-Behandlung ermittelt und mit dem RSV darüberhinaus entsprechende Untersuchungen nach UV- und Röntgen-Bestrahlung durchgeführt. Die gewonnenen Ergebnisse wurden anschließend statistisch ausgewertet.

A. Vorversuche

1. Inaktivierung der Onkogenität des RSV sowie der Infektiosität des AMV

Versuche mit einer den HLS-Viren sehr ähnlichen Virusart, dem NDV, hatten ergeben, daß ein gewisser Stamm desselben im Gegensatz zu anderen Stämmen und anderen RNS-haltigen Viren durch HA nicht inaktiviert wird (71,81). Es wurde zunächst untersucht, wie sich in dieser Hinsicht die von uns verwendeten HLS-Viren verhalten.

Der HA-Vorversuch mit RSV wurde, um gleichzeitig den Inaktivierungseffekt bei verschiedenen H-Ionen-Konzentrationen zu prüfen, bei pH 6,1, 7,5 und 9,1 durchgeführt.

Die Hydroxylaminlösungen wie auch die für die Virusverdünnungen benutzten P-Puffer wurden mit NaOH bzw. HCl auf die entsprechenden pH-Werte eingestellt. Für das Experiment wurde eine RSV-haltige Gewebekulturflüssigkeit in 12 gleichgroße Proben aufgeteilt. Je 4 Proben wurden durch Zugabe gleicher Volumina von P-Puffer auf die einzelnen pH-Werte gebracht. Nunmehr wurden die Röhrchen in ein Wasserbad (20° C) gestellt und zu verschiedenen Zeiten 2 M HA-Lösung des entsprechenden pH-Wertes im Verhältnis 1 : 1 zugesetzt. Die Überprüfung der pH-Werte nach Beendigung der Inaktivierung ergab eine Streubreite von 0,2 pH-Einheiten. Die Reaktion mit HA wurde in sämtlichen Proben gleichzeitig auf die unter "Methoden" beschriebene Weise gestoppt und anschließend die Onkogenität bzw. Infektiosität durch den Focus-Test bestimmt.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 5 zusammengefaßt. Wie daraus hervorgeht, erfolgt die Inaktivierung bei pH 6,1 schneller als bei pH 7,5 und 9,1. Die Kurve bei pH 6,1 verläuft über den ganzen Bereich linear, wogegen bei pH 7,5 bzw. 9,1 nach 1stündiger HA-Behandlung ein Knick in den entsprechenden Kurven zu beobachten ist. Ein ähnlicher Knick wurde auch in späteren Versuchen gefunden (s.S. 66). Für die unterschiedliche Geschwindigkeit der Inaktivierung bei verschiedenen pH-Werten könnte eine besondere Basenzusammensetzung der Virus-RNS im Hinblick auf Uracil und Cytosin verantwortlich sein. Eine weitere Möglichkeit ist, daß bei saurem pH die Hüllstruktur des Virus besser von HA durchdrungen werden kann als bei alkalischem pH.

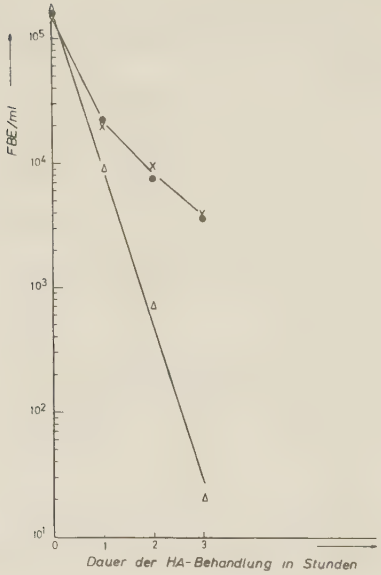

Abb. 5: Onkogenität von RSV nach HA-Behandlung bei verschiedenen pH-Werten.
Temperatur: 20° C.

Δ pH 6,1
● pH 7,5
x pH 9,1

Die H-Ionenkonzentration selbst hat aber sicher keinen Einfluß auf die Onkogenität des Virus. Darauf deutet die Feststellung hin, daß die 0-Stunden-Werte bei allen Proben gleich hoch sind. Außerdem ist aus anderen Untersuchungen bekannt, daß die HLS-Viren im pH-Bereich von 5 - 9 stabil sind.

Mit AMV wurde ein analoges Inaktivierungsexperiment durchgeführt. Die Behandlung mit HA erfolgte hier bei pH 7,5 und 25° C. Die Infektiosität der Proben wurde mit Hilfe der Endpunkttitration ermittelt. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 6 dargestellt. Wie daraus hervorgeht, verläuft die Inaktivierungskurve über einen Bereich von 7 $\log_{10}$ linear, was auf einen Ein-Treffer-Effekt der Reaktion mit dem HA schließen läßt (96).

Wie die beschriebenen Vorversuche zeigen, lassen sich die beiden in unseren Untersuchungen verwendeten HLS-Viren, das RSV und AMV, durch HA inaktivieren. Nach den Ergebnissen beim RSV verläuft diese Inaktivierung bei pH 6,1 schneller als bei pH 7,5 und 9,1.

In allen folgenden Versuchen wurde die Inaktivierung bei pH 7,5 und 20° C durchgeführt. Als Maß für die Inaktivierungsrate wird jeweils der Aktivitätsabfall nach 6stündiger HA-Behandlung in $\log_{10}$-Einheiten angegeben.

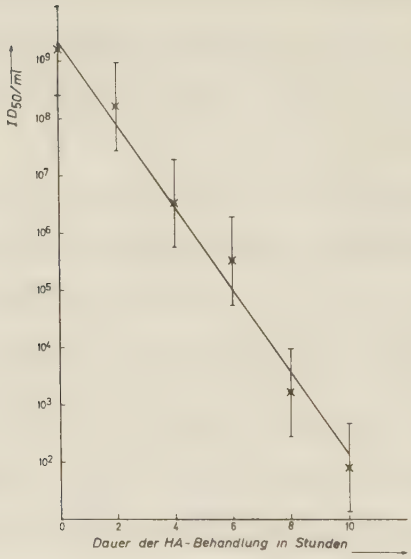

Abb. 6: Infektiosität von AMV nach Behandlung mit HA.
Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Endpunkttitration.
Temperatur: 25° C.

2. Wirkung des Hydroxylamins auf verschiedene Bestandteile des AMV

Voraussetzung für eine schlüssige Interpretation unserer Ergebnisse ist, daß HA auf die Nucleinsäure der HLS-Viren und nicht auf andere für die Infektiosität ebenfalls notwendige Virusbestandteile einwirkt. Obwohl dies nach den bisherigen bei anderen Viren, vor allem den Myxoviren, gesammelten Erfahrungen nicht zu erwarten ist (71,81), wurde diese Frage der Sicherheit halber noch einmal in einigen Vorversuchen geprüft. Aus den vorher angeführten Gründen (s.S. 11) wurde dafür ausschließlich AMV verwendet.

Als Virusmaterial diente infektiöses Hühnerplasma, das ca. 10^9 $ID_{50/ml}$ enthielt. Es wurde in verschiedene Portionen aufgeteilt und wie vorher beschrieben 0, 6 und 18 Stunden mit HA behandelt. Nach der Dialyse wurden die Proben bis zur Untersuchung bei -20° C gelagert.

Elektronenoptische Untersuchungen

Zunächst wurde untersucht, ob HA stärkere, bereits im Elektronenmikroskop feststellbare Veränderungen der Viruspartikeln verursacht. Derartige Veränderungen könnten z.B. zur Bildung von Virusaggregaten führen, die dann als solche nicht mehr infektiös sind.

Für die Prüfung dieser Frage wurde die Agarfiltrationstechnik verwendet. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen den verschieden behandelten Proben festgestellt.

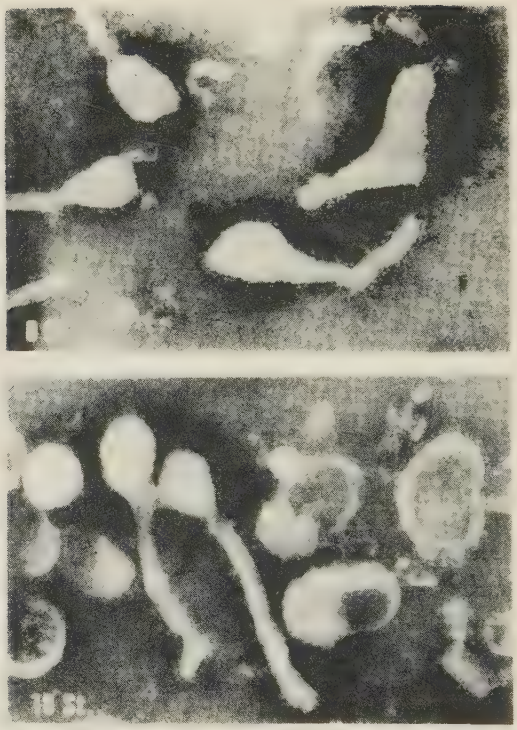

Abb. 7: Elektronenoptische Untersuchung von HA-behandeltem AMV.
Negativ-Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure.

0 St.: 0 Stunden lang behandeltes Virus
18 St.: 18 Stunden lang behandeltes Virus

Durch die Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure lassen sich Strukturuntereinheiten des Virus, wie z.B. die knopfförmigen Fortsätze an seiner Oberfläche darstellen. Auch mit dieser Methode ließen sich keine eindeutigen Veränderungen an den mit HA-behandelten Präparaten nachweisen (Abb. 7). Es wurde lediglich im Inneren einiger Partikeln Phosphorwolframsäure gefunden. Das könnte dadurch bedingt sein, daß ihre Oberfläche für Phosphorwolframsäure durchlässiger geworden ist. Die knopfförmigen Fortsätze waren an den HA-behandelten Teilchen noch ebenso gut zu beobachten wie an den unbehandelten Partikeln. Die langgestreckte Form einiger Virusteilchen in Abb. 7 wird unter den gewählten Bedingungen sehr häufig beobachtet.

Wirkung des Hydroxylamins auf das V-Antigen

Um den Einfluß des HA auf das wahrscheinlich in den knopfförmigen Fortsätzen enthaltene V-Antigen zu prüfen, wurden je 2ml der verschiedenen Proben 60 Minuten bei pi 10 ultrazentrifugiert und die gewonnenen Sedimente in gleichem Volumen P-Puffer aufgenommen. Das in ihnen enthaltene V-Antigen des Typs A und B wurde durch Verwendung der entsprechenden Indikatorviren im frühen Interferenzversuch ermittelt. Um genauere Inaktivierungskurven zu erhalten, wurden in einem weiteren Versuch Proben wie oben untersucht, die für 0, 0,5, 1, 2 und 3 Stunden mit HA behandelt worden waren.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 8 dargestellt. Danach werden die V-Antigene im Vergleich zur

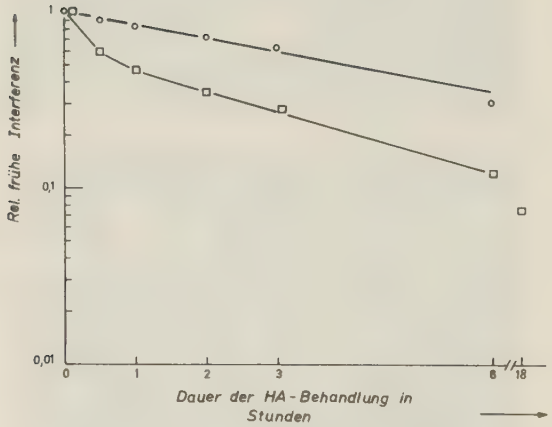

Abb. 8: Wirkung des HA auf das V-Antigen von AMV.

o A-Virus
□ B-Virus

Die eingetragenen Werte stammen aus zwei Versuchen.

Infektiosität (s. Abb. 6 und 12) nur relativ wenig durch HA geschädigt. Das V-Antigen des B-Virus scheint etwas empfindlicher als das des A-Virus zu sein. Aus einem Vergleich der V-Antigen- und Infektiositäts-Kurven geht außerdem hervor, daß Teilchen, die durch die Einwirkung von HA ihre Infektiosität verloren haben, noch in der Lage sein müssen, eine frühe Interferenz hervorzurufen. Ähnliches wurde auch bei HLS-Viren beobachtet, die durch höhere Temperaturen inaktiviert wurden (87).

Wirkung des Hydroxylamins auf das gs-Antigen

Eine weitere Komponente der HLS-Viren, die durch einen der verfügbaren biologischen Teste erfaßt werden kann, ist das im Inneren derselben enthaltene gs-Antigen. Um den Einfluß des HA auf diese Komponente zu untersuchen, wurden 0,4 ml der verschiedenen HA-behandelten Proben 1 : 10 mit P-Puffer verdünnt und dann 60 Minuten bei pi 10 ultrazentrifugiert. Die Sedimente wurden in einer dem Ausgangsvolumen entsprechenden Menge von P-Puffer aufgenommen und schließlich die Komplementbindungstiter der Ausgangsmaterialien und der gelösten Sedimente bestimmt. Durch das Zentrifugieren sollte geprüft werden, ob das gs-Antigen auch nach der HA-Behandlung noch in den sedimentierbaren Virusteilchen enthalten war.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tab. 1 zusammengestellt. Wie daraus hervorgeht, hatte die HA-Behandlung nahezu keinen Einfluß auf die KB-Aktivität des gs-Antigens. Ein Vergleich der im Ausgangsmaterial enthaltenen Aktivität mit der im Sediment zeigt, daß das gs-Antigen

trotz HA-Behandlung virusgebunden bleibt.

Stunden HA Behandlung	KB-Einheiten	
	Ausgangsmaterial	nach pi 10
0	$2^5 - 2^6$	2^6
6	$2^5 - 2^6$	$2^5 - 2^6$
18	$2^5 - 2^6$	2^5

Tab. 1: Wirkung des Hydroxylamins auf das gs-Antigen

Wirkung des Hydroxylamins auf die Virus-RNS

Für die Deutung unserer Inaktivierungsversuche war es weiterhin wichtig auszuschließen, daß die Virus-RNS bei der HA-Behandlung in kleinere Stücke zerlegt und somit schon durch e i n e n Treffer möglicherweise ihre gesamte biologische Aktivität verliert.

Der folgende Versuch wurde im Wesentlichen nach einer Methode von Bauer (11) durchgeführt. Je 4 ml AMV-haltiges Hühnerplasma (10^9 $ID_{50/ml}$) wurden 0 und 18 Stunden mit HA behandelt. Die Proben wurden dann mit P-Puffer 1 : 10 verdünnt und 60 Minuten bei pi 10 zentrifugiert. Die Sedimente wurden in 10 ml P-Puffer gelöst und die Viruslösung durch Zentrifugieren bei niederer Tourenzahl (10 Min. 3000 UpM) von gröberen Zellbestandteilen gereinigt. Darauf wurde das Virus nochmals 60 Minuten bei pi 10 ausgeschleudert und nunmehr in 0,8 ml Tris-Puffer je Probe aufgenommen. Die Konzentrate wurden auf präformierte Zuckergradienten

(1 ml 50 %, 2 ml 35 % und 1,5 ml 20 % Saccharose in Tris-Puffer) aufgelegt. Nach 60 Minuten langem Zentrifugieren im Rotor SW 39 bei 21 000 UpM und 20° C lag die das Virus enthaltene Bande etwa in der Mitte des Röhrchens. Dieses Material wurde entnommen, in 10 ml P-Puffer aufgenommen und das Virus 60 Minuten bei pi 10 abgeschleudert. Zu den Sedimenten wurden 0,5 ml einer 1 %igen Pronase-Lösung in P-Puffer gegeben, das Material suspendiert und 30 Minuten bei 22° C inkubiert. (Die Behandlung mit Pronase ist notwendig, um die im Virus enthaltene zellspezifische Ribonuclease zu zerstören, die andernfalls die freigesetzte RNS abbauen würde). Nunmehr wurden zu den beiden Proben je 2 Tropfen einer 1 %igen Natriumlaurylsulfat-Lösung gegeben, mittels der die Virus-RNS aus den Partikeln in Freiheit gesetzt wird. Die RNS wurde durch 17 Stunden langes Zentrifugieren (Rotor SW 25, 18 000 UpM, 15° C) in einem linearen, 15 - 30 %igen Saccharose-Gradienten von den übrigen Virusbestandteilen abgetrennt. Es wurden 30 gleichgroße Proben aus den Röhrchen entnommen und zur Lokalisierung der RNS die UV-Extinktion bei 260 mu bestimmt (Photospektrometer der Firma Carl Zeiss).

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 9 dargestellt. Ein Vergleich der Flächen beider 65 S-Gipfel zeigt, daß das 18 Stunden behandelte Virus nur etwa 1/3 weniger hochmolekulare RNS enthält als die 0-Stunden-behandelte Kontrolle. Dieser Unterschied ist im Vergleich zur Inaktivierung der Infektiosität, die unter gleichen Bedingungen etwa 10 log beträgt (s. Abb. 6), äußerst gering. Es ist somit sehr unwahrscheinlich, daß Strang-

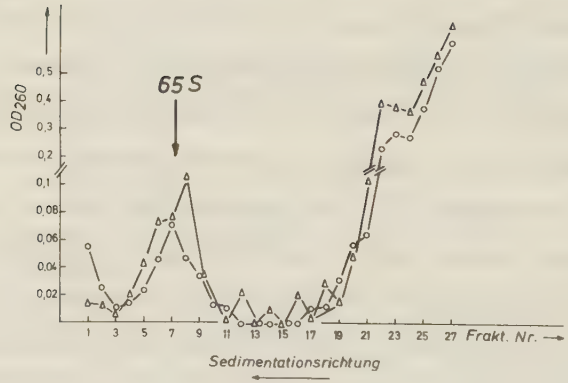

Abb. 9: Sedimentationsverhalten von AMV-RNS nach HA-Behandlung des Virus.
OD_{260} = Extinktion bei 260 mμ.

Δ 0 Stunden HA-behandeltes AMV
o 18 Stunden HA-behandeltes AMV

brüche der Virus-RNS bei der Inaktivierung des AMV durch HA eine wesentliche Rolle spielen.

3. Verhinderung von Sekundärinfektionen

Da bereits ca. 16 Stunden nach Infektion das erste neugebildete Virus aus den Gewebekulturzellen ausgeschleust wird, besteht ab dem 2. Tag die Möglichkeit einer Sekundärinfektion. Dies bedeutet, daß Zellen, die nicht primär infiziert wurden, durch neugebildetes Virus nachträglich infiziert werden können. Eine solche Sekundärinfektion kann auch, unter Umgehung der für die Penetration spezifischen Zellrezeptoren durch eine Übertragung der Virusinformation unmittelbar von Zelle zur Nachbarzelle erfolgen (29,100). Bei der Bestimmung der Inaktivierungskinetiken verschiedener Genfunktionen würde sich eine Sekundärinfektion sehr störend auswirken: In einer HA-behandelten AMV-Probe seien z.B. 1000 nichtinfektiöse Teilchen, die aber noch in der Lage sind, in der Zelle die Produktion von gs-Antigen zu induzieren. Ein einziges in der gleichen Probe befindliches infektiöses, d.h. vermehrungsfähiges Partikel könnte u.U. innerhalb von 4 Tagen nach Infektion die Produktion von mehr gs-Antigen veranlaßt haben, als die 1000 nichtinfektiösen zusammengenommen. Es mußten daher Bedingungen erarbeitet werden, die eine solche Sekundärinfektion verhinderten. Über derartige Versuche wird im Folgenden berichtet.

Durch Überschichtung der Zellen mit Agar oder durch Neutralisation neugebildeter Viren mit Antikörpern würde man lediglich die Sekundärinfektion über das

Nährmedium, nicht jedoch eine Infektion von Zelle zur Nachbarzelle verhindern. Es wurde daher nach einem Verfahren gesucht, das beide "Infektionswege" ausschließt.

Wie bereits auf S. 6 erwähnt, kann die Primärinfektion mit HLS-Viren durch Hemmung der DNS-Synthese unterdrückt werden. Für die laufende Virusproduktion ist demgegenüber eine weitere DNS-Synthese nicht mehr notwendig. Der in dieser Hinsicht bestuntersuchte DNS-Synthese-Inhibitor ist dasCytosin-Arabinosid (Ara-C), dessen Wirkung sich durch Zugabe von Desoxycytidin aufheben läßt. Bader (7) fand, daß die Virusinfektion weitgehend verhindert wird, wenn innerhalb von 8 Stunden nach Infektion $10^{-3,5}$ M Ara-C in das Nährmedium der Zellen gegeben werden. Für die vorliegenden Untersuchungen erschien es zweckmäßig, durch Zugabe von Ara-C 24 Stunden nach Infektion, d.h. ca. 8 Stunden nach dem Erscheinen des ersten neugebildeten Virus, die Sekundärinfektion zu unterbinden.

Virus-Dosis-Wirkungsversuch in Kulturen mit und ohne Ara-C

Wenn man die Sekundärinfektion nicht unterdrückt, werden zum Zeitpunkt der Ernte, d.h. nach 4 Tagen, auch bei Verwendung niedrigerer Virusdosen sämtliche Zellen oder ein großer Teil derselben infiziert sein. Beschickt man daher verschiedene Kulturen mit fallenden Dosen von Virus, so werden die einzelnen Ansätze in einem gewissen Multiplizitätsbereich nahezu gleichhohe Virusausbeuten liefern. Wird dagegen durch Zugabe von Ara-C die Sekundärinfektion verhindert, so sollten die Virusausbeuten linear mit der Abnahme der Infektionsdosen ab-

fallen. Ein derartiger Versuch wurde mit SR-RSV-1 durchgeführt, dessen Infektiosität durch den Focus-Test genauer bestimmt werden kann.

10 große Schalen wurden mit 2,5 x 10^6 Hühnerfibroblasten beschickt. Jeweils 2 davon wurden mit einer Verdünnung (7,5 x 10^5 bis herab zu 7,5 x 10^1 FBE, log_{10}-Verdünnungen) von SR-RSV-1 beimpft. 24 Stunden später wurden zur einen Hälfte der Kulturen 100 µg/ml Ara-C gegeben und nach weiteren 3 Tagen die Menge des in ihnen und in den analogen, unbehandelten Kontrollen enthaltenen Virus bestimmt. Den zur Titration der Infektiosität verwendeten Testschalen wurde 10^{-3} M Desoxycytidin zugegeben, um die Wirkung des Ara-C aufzuheben.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 10 zusammengefaßt. Danach ist, wie erwartet, die Virusausbeute in den Kontrollen, soweit sie mit 7,5 x 10^3 bis 7,5 x 10^5 FBE primär infiziert waren, nahezu gleich. Bei den darunterliegenden Infektionsdosen sinkt sie dann geringgradig ab. Im Gegensatz dazu fallen wie erwartet bei allen mit Ara-C behandelten Ansätzen die Virusausbeuten mit abnehmender Infektionsdosis ab. Diese Dosisabhängigkeit ist jedoch nicht vollkommen linear: Bei relativ hohen Inocula wird relativ wenig Virus gebildet. Aus Abb. 10 geht weiterhin hervor, daß die absolute Virusausbeute der Kulturen unter Ara-C bei einer Virusmultiplizität des Inoculums von 1 nahezu 2 log niedriger ist, als die der entsprechenden Kulturen mit normalem Nährmedium. Dies kann sowohl durch Nebenwirkungen des Ara-C (27) als auch durch den allgemein schlechteren Zustand der sich nicht mehr teilenden Zellen erklärt werden.

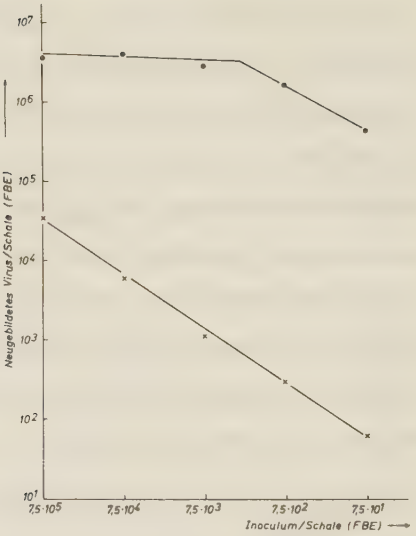

Abb. 10: Virus-Dosis-Wirkungsversuch in Kulturen mit und ohne Ara-C.

- ● Kulturen ohne Ara-C
- x Kulturen mit Ara-C

Ein solcher Nachteil des Ara-C wird jedoch, wie der soeben beschriebene Versuch zeigte, durch seine Eignung zur Unterdrückung der Sekundärinfektion von RSV in Hühnerfibroblastenkulturen wieder ausgeglichen.

B. Hauptversuche

1. AMV als Modellvirus für das Studium der differentiellen Inaktivierung

Unter Verwendung des AMV als Modell für LS-Viren wurde die Kinetik der durch HA bewirkten Inaktivierung der Infektiosität sowie der Fähigkeit zur Bildung von gs- und V-Antigen untersucht. Um zwischen den beiden im AMV enthaltenen Virustypen unterscheiden zu können, erfolgte die Bestimmung der Infektiosität im Gegensatz zu dem in Abb. 6 dargestellten Versuch mit Hilfe des vergleichenden Interferenzversuchs. Zur Untersuchung der Bildung von gs- und V-Antigen wurde den infizierten Kulturen zur Verhinderung von Sekundärinfektion 24 Stunden nach Infektion Ara-C zugegeben. Aus methodischen Gründen konnte in den infizierten Zellen lediglich der Gehalt an gs-Antigen bestimmt werden. Dagegen wurde in den Kulturflüssigkeiten neben dem gs-Antigen auch das V-Antigen erfaßt; die Bestimmung der Titer erfolgte 4 Tage nach Infektion. Zur Kontrolle wurde außerdem, wie oben beschrieben, die Infektiosität der Kulturflüssigkeiten bestimmt. Es wurde also neben der Infektiosität des HA-behandelten Virus (Infektiosität) dessen infektiöse Nachkommenschaft (Infektiosität der Nachkommenschaft) erfaßt (Abb. 11).

a) Bestimmung der Infektiosität

Tage nach Infektion

-1	Anlegen von Hühnerfibroblastenkulturen
0	Infektion mit verschiedenen AMV-Verdünnungen
3	Passagieren der Zellkulturen
4	Überinfektion mit verschiedenen RSV-Verdünnungen
11	Auszählen der Foci

b) Bestimmung der Infektiosität der Nachkommenschaft, der Bildung von gs- und V-Antigen

Tage nach Infektion

-1	Anlegen von Hühnerfibroblastenkulturen
0	Infektion mit unverdünntem AMV
1	Zugabe von Ara-C
4	Ernte → Überstände → Best. d. Infektiosität, gs- und V-Antig
	Ernte → Zellen → Best. d. gs-Antigens

Abb. 11: Versuchsschema zur Bestimmung biologischer Aktivitäten verschiedener Genfunktionen des AMV.

a) Inaktivierungskinetiken von AMV-Genfunktionen nach HA-Behandlung

Für die im Folgenden zu beschreibenden Versuche wurden Aliquots eines AMV-haltigen Hühnerplasmas (ca. 10^8 ID_{50}) jeweils 0, 2, 4 und 6 Stunden lang unter Standardbedingungen mit HA behandelt.

α) Infektiosität und Infektiosität der Nachkommenschaft

Die mittels des vergleichenden Interferenzversuchs erhaltenen relativen Infektiositätstiter wurden auf den 0-Stunden-Wert bezogen und in Abb. 12 dargestellt. Das Ergebnis zeigt, daß, wie zu erwarten, die entsprechenden Inaktivierungskinetiken der Infektiosität und der Infektiosität der Nachkommenschaft etwa parallel verlaufen. Dieser Befund bestätigt nochmals, was schon aus Vorversuchen mit RSV gefolgert wurde (Abb. 10): durch Zugabe von Ara-C 24 Stunden nach Infektion werden Sekundärinfektionen unterdrückt. Unter den vorliegenden Inaktivierungsbedingungen beträgt der Aktivitätsabfall in 6 Stunden ca. 3,4 log, wobei das B-Virus vergleichsweise stärker inaktiviert wird als das A-Virus. Diese Differenz dürfte auf der beobachteten unterschiedlichen Empfindlichkeit der V-Antigene beider im AMV enthaltenen Virustypen beruhen (s. Abb. 8).

ß) Bildung von gs- und V-Antigen

Zum Nachweis von gs- und V-Antigen wurden pro HA-Virusprobe 8 große Hühnerfibroblastenkulturen mit je 0,25 ml der jeweiligen Probe infiziert. Nichtinfizierte Kulturen dienten als Kontrollen.

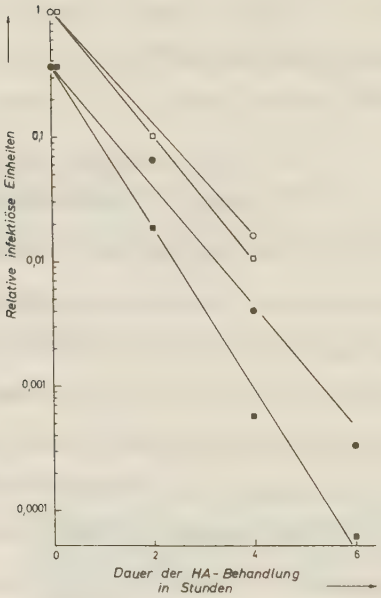

Abb. 12: Infektiosität von AMV nach Behandlung mit HA.
Die Bestimmung erfolgte im vergleichenden Interferenzversuch.

- o Infektiosität des A-Virus
- □ Infektiosität des B-Virus
- ● Infektiosität der Nachkommenschaft des A-Virus
- ■ Infektiosität der Nachkommenschaft des B-Virus

Nach dem in Abb. 11 gezeigten Schema wurden die Kulturflüssigkeiten 4 Tage später abgenommen, die Zellen trypsiniert, die den gleichen Werten entsprechenden Zellproben vereinigt und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert und das Sediment in je 1,5 ml Puffer suspendiert. Durch zehnmaliges Frieren und Tauen (abwechselnd CO_2-Alkohol-Kältebad und 37° C Wasserbad) wurden sie aufgebrochen, größere Zellbestandteile durch 20minütige Zentrifugation bei 3000 UpM entfernt und die Überstände in der KBR getestet.

Die Kulturflüssigkeiten der den gleichen Werten entsprechenden Proben wurden vereinigt und das Virus durch fraktioniertes Zentrifugieren angereichert. Die Virussedimente wurden in 3 ml P-Puffer suspendiert, in der KBR auf gs-Antigen und im frühen Interferenztest auf V-Antigen untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 eingetragen.

Da die Zellzahlen nur geringfügig voneinander abwichen, brauchten die biologischen Aktivitäten der untersuchten Genfunktionen nicht korrigiert zu werden. Um die Daten in Tabelle 2 zu veranschaulichen, wurde der 0-Stunden-Wert jeweils gleich 1 gesetzt und die anderen Werte hierauf bezogen. Die auf diese Weise erhaltenen Punkte sind in Abb. 13 in einem den Abbildungen 8 und 12 entsprechenden halblogarithmischen Diagramm dargestellt. In der gleichen Abbildung wurde zum Vergleich die Inaktivierungskinetik infektiöser Nachkommenschaft eingezeichnet. Die entsprechenden Werte wurden dem in Abb. 12 dargestellten Versuch entnommen.

Behandlungsdauer mit HA in Stunden	Zellzahl/ 8 Schalen	zellgebundenes gs-Antigen (KB-Einh.)	virusgebundenes gs-Antigen (KB-Einh.)	Virusgebundenes V-Antigen (Relative frühe Interferenz)	
				A-Virus	B-Virus
0	$2{,}8 \times 10^7$	2^6	2^9	4,0	9,5
2	$2{,}3 \times 10^7$	2^{4-5}	2^8	3,5	5,7
4	$2{,}3 \times 10^7$	2^{3-4}	2^{6-7}	3,2	4,1
6	$2{,}4 \times 10^7$	2^{2-3}	2^{5-6}	2,5	1,5
Kontrolle ohne Virus	$3{,}0 \times 10^7$	2^o	2^o	1,0	1,0

Tab.2: Biologische Aktivitäten des gs- und V-Antigens nach HA-Behandlung von AMV.

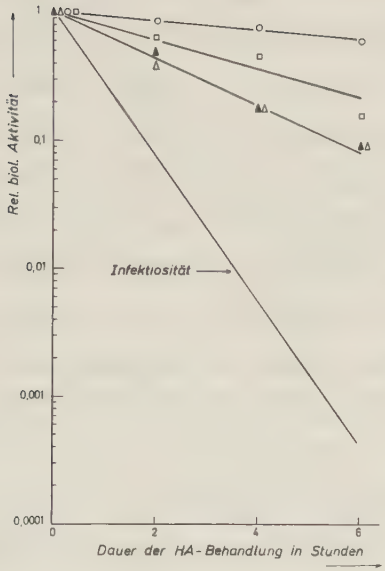

Abb. 13: Bildung von virusspezifischen Antigenen nach Infektion mit HA-behandeltem AMV.

▲ zellgebundenes gs-Antigen
△ gs-Antigen
o V-Antigen (A-Virus)
□ V-Antigen (B-Virus)

} Virusgebundene Antigene

Wie man aus Abb. 13 ersieht, ist der Aktivitätsabfall des zellgebundenen gs-Antigens deutlich geringer als der der Infektiosität, was sich als eine differentielle Inaktivierung beider Genfunktionen deuten läßt. Überraschenderweise zeigt die Inaktivierungskinetik der Bildung von virusgebundenem gs-Antigen nicht die gleiche Neigung wie die der Infektiosität, sondern deckt sich mit der für das zellgebundene gs-Antigen. Dieser Befund legt die Folgerung nahe, daß nach Infektion mit HA-behandeltem AMV nichtinfektiöse Virusteilchen gebildet werden. Eine derartige Interpretation wird durch die Inaktivierungskinetiken der Bildung von virusgebundenem V-Antigen gestützt. Der hierbei auftretende Unterschied in der Neigung der Kurven für beide im AMV enthaltenden Virustypen kann auf gleiche Weise wie auf S. 55 erklärt werden. Auf die Deutung der Ergebnisse im Hinblick auf die relativen Treffbereiche für die einzelnen Genfunktionen wird in den abschließenden Besprechungen eingegangen.

b) Kontrollversuch zur differentiellen Inaktivierung

Gegen die im vorigen Abschnitt beschriebenen Befunde ließe sich einwenden, daß die beobachteten relativ flachen Inaktivierungskinetiken der Bildung des gs- und V-Antigens auf das ursprüngliche Inoculum zurückzuführen seien. Es ist nämlich bekannt, daß nur etwa 0,1 - 1 % des verwendeten Virus infektiös ist (13). Deshalb wäre denkbar, daß ein beträchtlicher Teil des nichtinfektiösen Inoculums zunächst zwar adsorbiert wird, aber bis zum Erntezeitpunkt wieder in das Kultur-

medium gelangt. Um dieses Argument zu entkräften und um ein Maß für die Genauigkeit der verwendeten Techniken zu erhalten, wurde ein Kontrollversuch durchgeführt, in dem die Inaktivierung durch Ausverdünnung simuliert wurde. Vom 0-Stunden behandelten Virus ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe (0,5 $\log_{10}$ Schritte) hergestellt und mit den Verdünnungen Kulturen infiziert. Da man bei den Proben einer Verdünnungsreihe nicht nur die infektiösen, sondern (im Gegensatz zu den Proben einer Inaktivierungsreihe) auch die physikalischen Teilchen ausverdünnt, wurde jede Probe mit der gleichen Menge an unverdünntem, 18 Stunden lang inaktiviertem AMV gemischt. Hiermit ist die Menge des im Inoculum enthaltenen gs- und V-Antigens in allen Verdünnungsproben größenordnungsmäßig gleich. Da das 18 Stunden lang behandelte und damit nicht mehr infektiöse Virus außerdem immer noch in der Lage ist, zu interferieren (Abb. 8), wurden auf diese Weise in den Proben der Verdünnungsreihe ähnliche Multiplizitätsverhältnisse wie in den Proben der Inaktivierungsreihe hergestellt. Dies ist im Hinblick auf das später diskutierte (s.S. 66) Autointerferenzphänomen besonders wichtig (s. Tab. 3).

Die Infektiosität der Nachkommenschaft wurde in diesem Versuch mit Hilfe der Endpunkttitration bestimmt; die Punkte für das V-Antigen stellen den Mittelwert aus zwei Versuchen dar.

Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt. Durch Anpassen des Abscissen-Maßstabes wurde die Inaktivierungskinetik der infektiösen Nachkommenschaft (Abb. 12) mit der theoretischen Verdünnungskinetik zur Deckung ge-

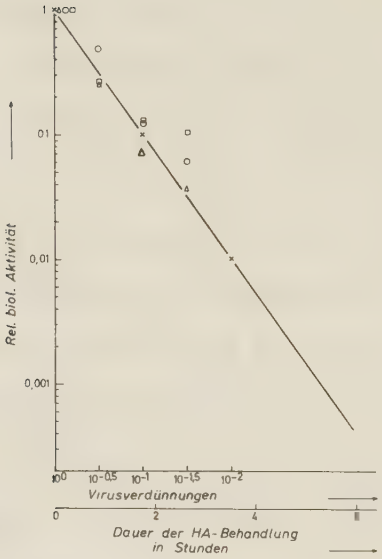

Abb. 14: Bildung von Virusteilchen nach Infektion mit AMV in Abhängigkeit von der Konzentration des Inoculums.
Die eingezeichnete Gerade entspricht der theoretischen Verdünnungskinetik und der Inaktivierungskinetik der Infektiosität von AMV nach HA-Behandlung.

x Infektiosität (± 0,8 log)
Δ gs-Antigen
o V-Antigen (A-Virus)
□ V-Antigen (B-Virus)

bracht. Der Vergleich von Abb. 13 und 14 zeigt deutlich, daß bei gleichem Infektiositätsabfall die mittels einer Verdünnungsreihe erhaltenen Punkte für die gs- und V-Antigen-Bestimmungen deutlich unterhalb der entsprechenden Punkte für das HA-behandelte Virus liegen. Sie stimmen mit der theoretischen Verdünnungskinetik in etwa überein.

Damit wurde gezeigt, daß der Nachweis der differentiellen Inaktivierung verschiedener Genfunktionen von HA-behandeltem AMV nicht auf einer Messung von Artefakten beruht.

2. RSV als Modellvirus für das Studium der differentiellen Inaktivierung

Die bisherigen Befunde mit dem AMV ergaben, daß das Hydroxylamin unter den gewählten Bedingungen für eine differentielle Inaktivierung des Genoms von Hühnertumorviren geeignet ist. Am Beispiel des RSV als Modell eines Sarkomvirus konnte nun die Frage nach dem relativen Treffbereich für die Onkogenität im Vergleich zu dem für die Infektiosität untersucht werden. Entsprechend den Befunden von Goldé und Latarjet beim RSV (49) wurde zunächst als Arbeitshypothese angenommen, daß der Treffbereich für die Onkogenität kleiner ist als der Treffbereich für die Infektiosität. Für alle im Folgenden beschriebenen Versuche wurden frühe Passagen eines dreimal geklonten und durch Zentrifugation angereicherten SR-RSV-1 verwendet.

a) Inaktivierungskinetiken von RSV-Eigenschaften nach HA-Behandlung

Zunächst wurden die Inaktivierungskinetiken der Onkogenität und der Infektiosität des RSV verglichen. Durch diesen Vergleich und mittels der Untersuchung einzelner Foci auf ihre Virusproduktion wurde die Arbeitshypothese geprüft. Da sich keinerlei Anhaltspunkte für deren Richtigkeit ergaben, wurde untersucht, ob bei Sarkom-Viren eine differentielle Inaktivierung verschiedener Genfunktionen durch HA-Behandlung überhaupt möglich ist. Nach positiven Befunden hierzu wurde erfolglos versucht, mittels anderer inaktivierender Agentien eine differentielle Inaktivierung der Onkogenität und Infektiosität zu erreichen. Nach Durchführung einer statistischen Berechnung wurde schließlich die Arbeitshypothese zugunsten eines anderen Modells fallengelassen.

α) Onkogenität

Gleiche Proben eines in Kalbserum-haltigen Puffer suspendierten, angereicherten RSV wurden in der unter "Methoden" angegebenen Weise mit HA behandelt und anschließend die Onkogenität bestimmt. Die aus 5 Versuchen zusammengefaßten Werte sind in Abb. 15 dargestellt, wobei die auf der Ordinate aufgetragenen biologischen Aktivitäten auf 1 bezogen wurden. Der Aktivitätsabfall in 6 Stunden beträgt ca. 2,2 log und ist vergleichsweise geringer als derjenige für die Infektiosität von AMV mit ca. 3,4 log (Abb. 12). Der Verlauf der beobachteten Inaktivierungskurve läßt sich durch eine Ein-Treffer-Kinetik für zwei Viruspopulationen interpretie-

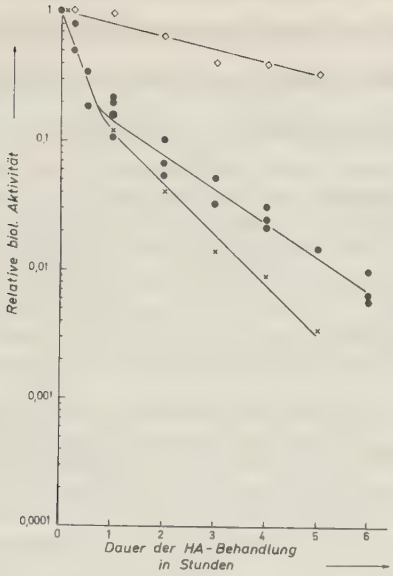

Abb. 15: Onkogenität, Infektiosität und Bildung C^{14}-Leucin-markierter Teilchen nach Infektion mit HA-behandeltem RSV.

- ● Onkogenität
- x Infektiosität
- ◇ C^{14}-Leucin-markierte Teilchen

ren. Die wahrscheinlichste Erklärung für den durch diese Heterogenität bedingten Knick in der Kurve ist eine unterschiedliche Permeabilität der Virushüllen gegenüber dem HA. Angesichts der Tatsache, daß ein geklonter Virusstamm verwendet wurde, scheinen Unterschiede im Genom weniger wahrscheinlich.

Bei der Bestimmung der Onkogenität im Focus-Test fiel auf, daß sich die Dosis-Wirkungsbeziehung bei steigenden Inaktivierungszeiten zunehmend veränderte. Ein repräsentatives Experiment ist in Tab. 3 dargestellt.

HA-Behandlung in Stunden	RSV-Verdünnungen (Inoc.: 0,2 ml/Schale)					
	10^{0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
0	-	-	-	1000	200	22
6	-	59	85	22	-	-
8	2	10	20	-	-	-

Tab. 3: Bestimmung der Onkogenität von HA-behandeltem RSV (FBE/Schale)

So wurden z.B. entgegen den Erwartungen für den 8-Stunden-Wert bei den Verdünnungen 10^{0} und 10^{-1} nicht 100 bzw. 10mal mehr Foci als bei der Verdünnung 10^{-2} erhalten, sondern sogar weniger. Da gezeigt werden konnte, daß die durch HA-Behandlung nichtinfektiös gewordenen Virusteilchen noch in der Lage sein können, zu interferieren (Abb. 8), läßt sich dieses Phänomen als Autointerferenz deuten. Legt man zur Berechnung der Virusmultiplizität pro Zelle die Onkogenität des Ausgangsmaterials zugrunde

(5×10^8 FBE/ml), so erhält man bei Infektion von 1×10^6 Zellen für die Verdünnungen bis zu 10^{-2} Multiplizitäten von über 1. Das Ausmaß der Autointerferenz sollte für eine bestimmte Verdünnung der verschiedenen Proben gleich sein, da sie die gleiche Konzentration an physikalischen Virusteilchen enthalten. Wie aus Tab. 3 zu ersehen ist, wird der Effekt aber umso deutlicher, je weniger onkogene im Verhältnis zu physikalischen Teilchen in einer Probe vorhanden sind. Zur Berechnung der Onkogenitätstiter wurden lediglich Focus-Zahlen berücksichtigt, bei denen die Virusmultiplizität des Inoculums höchstens 1 betrug. Die Differenz zwischen dem Titer des Ausgangsmaterials und dem des 0-Stunden-Wertes ($1{,}1 \times 10^7$ FBE/ml), beruht in erster Linie auf dem Aktivitätsverlust, der aufgrund des Dialysierens der Proben zustande kommt.

ß) Infektiosität

Zur Bestimmung der Infektiosität wurden analog zu den für AMV beschriebenen Versuchen (s.S. 53) Zellkulturen mit unverdünnten, HA-behandelten RSV-Proben infiziert und 24 Stunden danach Ara-C zugegeben. Die Kulturflüssigkeiten wurden nach 4 Tagen geerntet und im Focus-Test titriert. Um die Wirkung des im Inoculum enthaltenen Ara-C zu revertieren, wurde den Testkulturen je 10^{-3} M Desoxycytidin zugegeben.

Wie man aus dem in Abb. 15 dargestellten Ergebnis ersehen kann, ist der Aktivitätsabfall von 2,9 log in 6 Stunden vergleichsweise größer als der für die Onkogenität. Der steilere Aktivitätsabfall der Infektiosität

deutet auf eine differentielle Inaktivierung im Sinne der Arbeitshypothese hin. Dieser Unterschied kann aber auch durch die im vorigen Abschnitt beschriebene Autointerferenz erklärt werden. Während nämlich zur Bestimmung der Onkogenität lediglich Schalen berücksichtigt wurden, deren Inoculum einer Multiplizität unter 1 entsprach, wurden zur Bestimmung der Infektiosität die Kulturen mit unverdünntem Virus, d.h. mit einer Multiplizität über 1 beimpft. Mit zunehmender Behandlungszeit der RSV-Proben ändert sich das Verhältnis von infektiösen zu physikalischen Virusteilchen zugunsten der letzteren. Als Folge davon macht sich die Autointerferenz immer mehr bemerkbar (s. Tab. 3), was in einer im Vergleich zur Onkogenität steileren Inaktivierungskurve der Infektiosität zum Ausdruck kommt.

Untersuchung einzelner Foci auf ihre Virusproduktion

Die in den beiden vorigen Abschnitten beschriebenen Untersuchungen ergaben keinen sicheren Hinweis für eine differentielle Inaktivierung der Onkogenität und Infektiosität. Zur weiteren Untersuchung der Arbeitshypothese (s.S. 63) wurde daher eine Methode angewendet, die mit größerer Sicherheit eine Aussage über diese Frage erlaubt und die auf folgenden Überlegungen beruht: Bei Zutreffen der Arbeitshypothese müßten in einer RSV-Population nach HA-Behandlung Teilchen entstehen, die einen Treffer außerhalb des Treffbereiches für die Onkogenität aufweisen. Solche Teilchen würden nicht-virusproduzierende (NVP) Foci erzeugen,

da sie zwar nicht mehr infektiös, aber noch in der Lage wären, Zellen zu transformieren. In dem im nächsten Abschnitt beschriebenen Versuch wurde nach derartigen NVP-Foci gesucht.

Bei der Untersuchung von geklonten Foci auf onkogene Nachkommenschaft ist zu berücksichtigen, daß nicht nur das RSV, sondern auch jede transformierte Zelle auf Testkulturen einen Focus erzeugen kann, unabhängig davon, ob sie Virus produziert oder nicht. Es wurde daher ein Filtrationsschritt eingeschaltet, durch den die transformierten Zellen vom löslichen Virus getrennt werden. Der technische Vorgang ist in Abb. 16 skizziert. Die Trypsinbehandlung (Abb. 16,II) hat den Sinn, die Focus-Zellen aus dem Verband herauszutrennen und gleichzeitig zellassoziiertes Virus zu lösen (1,97). Als positive Kontrolle dafür, daß im Einzelfall wirklich ein Focus von transformierten Zellen aufgepickt worden war, wurde das nach Zentrifugation gewonnene Zellsediment auf Testkulturen übertragen (Abb. 16,IV). Der Nachweis von Focusbildenden Viren im filtrierten Überstand der transformierten Zellen gilt als Beweis für die Virusproduktion des untersuchten Focus (Abb. 16,V). Die verwendeten Millipore-Vorfilter (AP2501300) wurden schon von anderen Autoren zur Trennung von Virus und Zellen eingesetzt (101). Eigene Versuche ergaben, daß mit einem derartigen Filter mindestens 10^5 Zellen verläßlich entfernt werden können, während ein geklonter Focus höchstens 500 Zellen enthielt.

Zum Klonen wurden ausschließlich Kulturen verwendet, die mit Virus infiziert waren, dessen Onkogenität um 2 log oder mehr inaktiviert worden war. Außerdem wurden Schalen

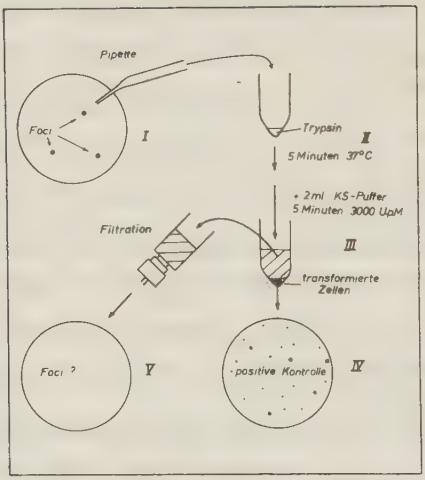

Abb. 16: Schematische Darstellung der Prüfung eines Focus auf Virusproduktion.

I-V Reihenfolge der Schritte

KS-Puffer = P-Puffer mit 10 % Kalbserum

ausgesucht, die im Schnitt nicht mehr als 5 - 10 Foci enthielten. In 3 verschiedenen Versuchen wurden insgesamt 53 Foci auf ihre Virusproduktion geprüft. Alle auf diese Weise untersuchten Foci produzierten Virus. Um eine Aussage über die Signifikanz dieses Ergebnisses zu machen, wurden weiter unten statistische Berechnungen durchgeführt (s.S. 78). Zur Kontrolle, daß nicht etwa onkogenes Virus unter dem Agar-Overlay-Medium über die ganze Kultur diffundiert war, wurden von 2 Kulturen, die 20 bzw. 22 Foci enthielten, Zellen an je 5 Stellen zwischen den Foci herausgepickt. Ein onkogenes Virus ließ sich in diesen Isolaten nicht nachweisen.

γ) Bildung physikalischer Virusteilchen

Den im letzten Abschnitt beschriebenen Versuchen zufolge lassen sich Onkogenität und Infektiosität von RSV durch HA-Behandlung nicht differentiell inaktivieren. Es stellte sich die Frage, ob die mit dem AMV erzielte differentielle Inaktivierung von Infektiosität und Fähigkeiten zur Bildung von Virusstrukturkomponenten auch beim RSV gelingt.

Um dies zu prüfen, konnten nicht dieselben Methoden verwendet werden wie für das AMV. Wie bereits erwähnt, sind die in vitro erreichbaren Konzentrationen biologisch aktiver Produkte des RSV vergleichsweise viel niedriger als die des AMV. Es ist daher schwierig, im Falle des RSV die Bildung von gs-Antigen mit Hilfe der KBR zu untersuchen. Aus methodischen Gründen ist auch die Be-

stimmung des V-Antigens nicht möglich (s.S. 11). Der Nachweis einer unterschiedlichen Inaktivierung von Infektiosität und Fähigkeit zur Bildung physikalischer Virusteilchen des AMV (s.S. 60) erlaubte aber, unter Anwendung einer empfindlicheren Technik einen ähnlichen Versuch mit dem RSV durchzuführen. Dies geschah, indem die durch ihr Sedimentationsverhalten charakterisierbaren physikalischen Viruspartikeln durch den Einbau radioaktiver Aminosäuren markiert wurden. Ein derartiger Versuch wird im Folgenden beschrieben.

Je 2 kleine Schalen wurden mit je einer Probe von 0, 1, 2, 3, 4, 5 und 16 Stunden HA-behandeltem RSV beimpft. Die 16-Stunden-Probe diente als Kontrolle, da sie den in Abb. 15 dargestellten Ergebnissen zufolge kein infektiöses Virus mehr enthalten sollte. Die weitere Versuchsanordnung entsprach der in Abb. 11 schematisch dargestellten. 48 Stunden nach Infektion erhielt je 1 Schale pro Wert 1,2 μC C^{14}-Leucin. Zur Ernte wurden die Zellen der nichtmarkierten Kulturen gezählt und die beiden Kulturflüssigkeiten der entsprechenden Werte vereinigt. Das durch fraktionierte Zentrifugation hieraus erhaltene Virussediment wurde zweimal mit 1 ml P-Puffer gewaschen, in 0,7 ml P-Puffer aufgenommen und zur weiteren Reinigung in einem Saccharose-Gradienten (1 ml 50 %, 2 ml 35 %, 1,5 ml 20 % Saccharose in Tris-Puffer) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation im Schwingrotor 25 (60 Minuten, 21 000 UpM, 4° C) wurden die Gradienten in 8 gleichgroße Proben fraktioniert. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde, wie unter Methoden angegeben, bestimmt.

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden in Abb. 17 nur die Werte für die 0, 2, 4 und 16 Stunden Behandlungszeiten eingetragen. Von den Fraktionen des 0-Stunden-Wertes wurde die Onkogenität ermittelt und das Ergebnis in der gleichen Abbildung dargestellt. Demnach entspricht der mittlere der drei Gipfel dem infektiösen Virus, während die beiden anderen Gipfel wahrscheinlich Zelldetritus bzw. Viruszerfallsprodukte darstellen. Die Menge der Impulse/Min. in Fraktion 5 wurde als ein Maß für die Bildung von physikalischen Virusteilchen genommen. Diese Werte abzüglich der Radioaktivität des 16-Stunden-Wertes wurden auf den 0-Stunden-Wert bezogen und in Abb. 15 dargestellt.

Ähnlich wie beim AMV (Abb. 13) verläuft die Inaktivierungskurve für die Bildung physikalischer (C^{14}-Leucin markierter) Virusteilchen wesentlich flacher als diejenige für die Bildung von infektiösem Virus. Somit wurde gezeigt, daß auch beim RSV verschiedene Genfunktionen durch HA-Behandlung differentiell inaktiviert werden können.

b) Untersuchung der differentiellen Inaktivierung nach Bestrahlung des RSV

Aus den vorigen Versuchen läßt sich noch nicht mit Sicherheit folgern, daß eine differentielle Inaktivierung von Onkogenität und Infektiosität nicht möglich ist. Es wäre nämlich denkbar, daß ein Teil des Virusgenoms in einer dem HA nicht zugänglichen Form vorliegt. Lediglich der für die Onkogenität verantwortliche Abschnitt könnte

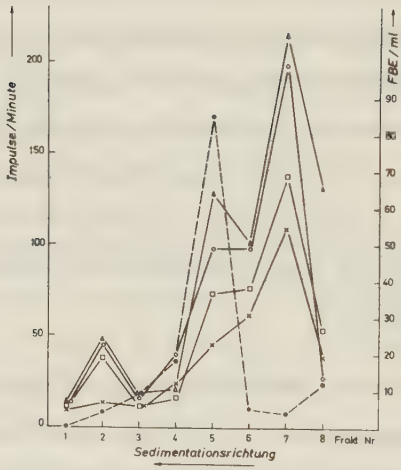

Abb. 17: Sedimentationsverhalten C^{14}-Leucin-markierten Teilchen nach Infektion mit HA-behandeltem AMV.

△-△ 0 Stunden HA-Behandlung
o-o 2 Stunden HA-Behandlung
□-□ 4 Stunden HA-Behandlung
x-x 16 Stunden HA-Behandlung
●..● Infektiosität des 0-Stunden-Wertes

dann "getroffen" werden. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde versucht, eine differentielle Inaktivierung mit Hilfe anderer inaktivierender Agenzien nachzuweisen, deren Reaktion mit der RNS wahrscheinlich anders verläuft als die des Hydroxylamins.

Röntgenstrahlen und Ultraviolett-(UV)-Strahlen gehören zu den bestuntersuchten physikalischen Mutagenen. Die durch diese Strahlen verursachte Inaktivierung kann auf direkten oder indirekten Effekten beruhen. Bei den direkten findet eine Wechselwirkung von Quanten mit den Basen der Nucleinsäure statt. Bei den indirekten entstehen im wässrigen Lösungsmittel hochaktive Verbindungen wie Radikale und Peroxyde, die ihrerseits mit der Nucleinsäure reagieren können (107). Durch Anwesenheit von Proteinen im Lösungsmittel wird die Nucleinsäure weitgehend vor den indirekten Effekten geschützt (56,61,107). Da nicht bekannt ist, welcher der beiden Effekte die differentielle Inaktivierung fördert, wurde Virus in Medium mit zwei verschiedenen Kalbserumkonzentrationen bestrahlt, so daß einmal die direkten, das andere Mal die indirekten Effekte überwiegen sollten.

Die Inaktivierungskinetiken der Onkogenität nach Bestrahlung von RSV mit Röntgen- und UV-Strahlen in 0,8 % und 30 % Kalbserum sind in Abb. 18 und 19 dargestellt. Aus einem Vergleich der für die beiden Serumkonzentrationen erhaltenen Werte ist zu ersehen, daß das Serum einen schützenden Effekt auf das Virus ausübt. Durch Anwendung des in Abb. 16 dargestellten Verfahrens wurden einzelne Foci auf ihre Virusproduktion untersucht. Wie das in Tab. 4 zusammengestellte Ergebnis zeigt, konnte ebenso

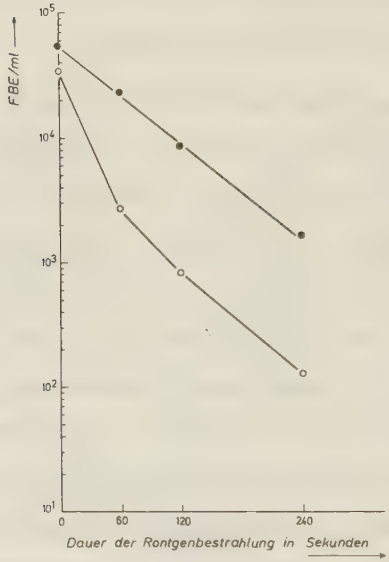

Abb. 18: Onkogenität von RSV nach Röntgenbestrahlung.

- ● Virus während der Bestrahlung in 30 % Kalbserum suspendiert
- ○ Virus während der Bestrahlung in 0,8 % Kalbserum suspendiert

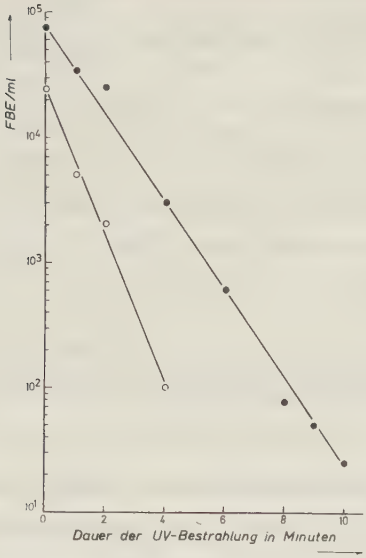

Abb. 19: Onkogenität von RSV nach UV-Bestrahlung.

- ● Virus während der Bestrahlung in 30 % Kalbserum suspendiert
- o Virus während der Bestrahlung in 0,8 % Kalbserum suspendiert

wie beim HA-behandelten Virus (s.S. 71) kein NVP-Focus nachgewiesen werden. Die Signifikanz dieser Zahlen wird im folgenden Abschnitt statistisch geprüft.

Strahlung	Kalbserum-konzentration	Bestrahlungs-zeit	Anteil überlebender Foci	Anzahl untersuchter Foci	Anzahl NVP-Foci
Röntgen	30 %	240 Sek.	$10^{-1,5}$	20	0
Röntgen	0,8 %	240 Sek.	$10^{-2,6}$	19	0
UV	30 %	8 Min.	$10^{-3,5}$	35	0

Tab. 4: Versuch zur Isolierung von nicht-virusproduzierenden Foci nach Bestrahlung von RSV

Man könnte gegen diese Befunde immer noch einwenden, daß nur deshalb keine NVP-Foci gefunden wurden, weil diese so klein sind, daß sie nicht erkannt wurden. Dies könnte dadurch begründet sein, daß für die Bildung eines nach ca. 7 Tagen makroskopisch sichtbaren Focus die Sekundärinfektion von Zelle zu Zelle eine wesentliche Rolle spielt. Dieser Einwand ist jedoch aufgrund der Experimente von Temin und Rubin nicht stichhaltig, wonach für die Bildung eines Focus praktisch ausschließlich die Teilung der transformierten Zellen notwendig ist (94).

c) Statistische Berechnungen

Wie in den vorigen Kapiteln beschrieben wurde, gelang es trotz verschiedener Inaktivierungsmethoden nicht, RSV-Teilchen zu erhalten, deren onkogene Fähigkeit nach In-

aktivierung der Infektiosität noch erhalten blieb. Dieser Befund läßt vermuten, daß der Treffbereich für die Onkogenität entgegen der Arbeitshypothese (Abb. 20,1) nicht kleiner ist als derjenige für die Infektiosität (Abb. 20,0). Um die Richtigkeit dieser Vermutung zu prüfen, wurden einige statistische Berechnungen angestellt.

Definitionen: Die Annahme, daß der Treffbereich für die Onkogenität kleiner ist als derjenige für die Infektiosität, wird im Einklang mit der ursprünglichen Arbeitshypothese als die Eins-Hypothese bezeichnet; die Annahme, daß er nicht kleiner ist, entspricht der Null-Hypothese. (An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß der Begriff Treffbereich ebenso wie die den Hypothesen zugehörigen, in Abb. 20 dargestellten Genom-Modelle einen rein formalen Charakter besitzen) Der Quotient aus den Treffbereichen der Onkogenität (On) und Infektiosität (In) wird als α definiert, $\frac{On}{In} = \alpha$. Da In = 1 gesetzt wird, gibt α direkt den relativen Treffbereich der Onkogenität an. Bei Zutreffen der Eins-Hypothese ist $0 < \alpha < 1$, bei Ausschließung der Eins-Hypothese (Null-Hypothese) ist $\alpha = 1$. Virusproduzierende (VP) Foci werden durch Virusteilchen erzeugt, die weder in On noch in In einen Treffer aufweisen. Entsprechend entstehen NVP-Foci durch Teilchen, die einen Treffer innerhalb von In aber außerhalb von On haben. Der Anteil an NVP-Foci unter allen untersuchten (n) Foci wird als p definiert. D ist die Dosis des inaktivierenden Agens. Der Verdünnungsfaktor K gibt die Abnahme der Onkogenität in $\log_{10}$ Einheiten für eine bestimmte Dosis des inaktivierenden Agens an.

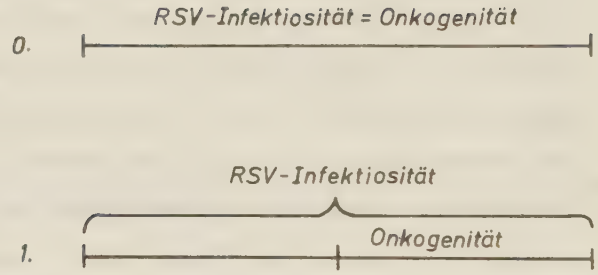

Abb. 20: Theoretische Modelle für das RSV-Genom im Hinblick auf die Treffbereiche für Onkogenität und Infektiosität.

Beschreibung des statistischen Ansatzes: Alle Überlegungen und Berechnungen gehen von der Annahme aus, daß die Eins-Hypothese zutrifft. Der Anteil an NVP-Foci nimmt mit der Erhöhung der Dosis des inaktivierenden Agens zu. Das logarithmische Verhältnis der Abnahme aller Foci zur Abnahme der VP-Foci dagegen bleibt konstant und reflektiert das Verhältnis Onkogenität zu Infektiosität. Der Anteil p der NVP-Foci unter den bei einer bestimmten Dosis überlebenden Foci ist somit ein Maß für α. Obwohl, anders als erwartet, alle untersuchten Foci vom VP-Typ waren, kann durch die Beziehung zwischen p und α ein oberer, mit den beobachteten Daten noch verträglicher Grenzwert für die Differenz zwischen On und In errechnet werden, falls α der Eins-Hypothese entsprechend doch kleiner als 1 sein sollte.

Berechnungen: Die Gesamtzahl der Foci besteht aus einem Anteil NVP- und einem Anteil VP-Foci. Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Foci ist für eine bestimmte Dosis D des inaktivierenden Agens gleich:

$$W_{(Foci)} = e^{-On \cdot D}$$

Sie setzt sich aus den Einzelwahrscheinlichkeiten für das Überleben von NVP- und VP-Foci zusammen:

$$W_{(Foci)} = W_{(NVP+VP)}.$$

Da die VP-Eigenschaft durch einen Treffer in In zerstört wird, gilt für die Überlebenswahrscheinlichkeit der VP-Foci:

$$W_{(VP)} = e^{-In \cdot D} \qquad (1)$$

Da für die NVP-Eigenschaft einerseits ein Treffer in In-On Voraussetzung ist, sie andererseits durch einen Treffer in On zerstört wird, gilt für die NVP-Foci:

$$W_{(NVP)} = 1 - e^{-(In-On)\cdot D} \cdot e^{-On\cdot D} \quad (2)$$

(2) läßt sich zu:

$$e^{-\alpha\cdot In\cdot D} \cdot e^{-In\cdot D} \text{ umformen,} \quad (3)$$

indem On durch $\alpha \cdot$ In ersetzt wird. Der erwartete Anteil p an NVP-Foci unter allen Foci ist bei einem gegebenem α

$$p = \frac{W_{(NVP)}}{W_{(VP)} + W_{(NVP)}} \quad (4)$$

Durch Einsetzen von (1) und (3) in (4) erhält man:

$$p = \frac{e^{-\alpha\cdot In\cdot D} - e^{-In\cdot D}}{e^{-\alpha\cdot In\cdot D} - e^{-In\cdot D} + e^{-In\,D}} = 1 - e^{-(1-\alpha)\cdot In\cdot D} \quad (5)$$

Aus Formel (5) erhält man:

$$\alpha = 1 + \frac{\log (1-p)}{In\cdot D\cdot \log e} \quad (6)$$

In·D läßt sich unter Einbeziehung der bei einer bestimmten Dosis überlebenden Foci ($e^{-On\cdot D}$) auch anders ausdrücken: $e^{-On\cdot D} = 10^{-K}$. On läßt sich durch $\alpha\cdot$In ersetzen, wodurch:

$$In\cdot D = \frac{K}{\alpha\cdot \log e} \quad \text{wird.} \quad (7)$$

Setzt man (7) in (6) ein ergibt sich:

$$\alpha = \frac{K}{K-\log (1-p)} \quad (8)$$

Mit dieser Beziehung zwischen dem Verhältnis der Treffbereiche für die Onkogenität und Infektiosität und dem gefundenen Anteil von NVP-Foci unter allen Foci (bei einem bestimmten Anteil an überlebender Foci) läßt sich die Eins-Hypothese prüfen.

Die Untersuchung der n Foci ergab in allen Fällen p = 0 (s.S. 71,78). Es sei po der obere Grenzwert für den unbekannten Wert des wahren Anteils p von NVP-Foci unter allen Foci. Mittels dieses Wertes ergibt sich durch die Beziehung (8) ein unterer Grenzwert für den wahren Wert von α (α_u), falls $\alpha < 1$ sein sollte.

$$\alpha_u = \frac{K}{K\text{-}\log\,(1\text{-}po)}$$

Die Werte für po für eine Wahrscheinlichkeit von 95 % entstammen einer Tabelle aus Documenta Geigy, 6. Auflage. Sie sind mit den hieraus errechneten Werten für α_u in Tab. 5 zusammengefaßt. Sofern die Eins-Hypothese zutrifft, ergibt sich aus den α_u-Werten, daß die untere Grenze für die Größe des Treffbereichs der Onkogenität bezogen auf den Treffbereich der Infektiosität zwischen 94,9 % und 98,9 % liegt.

Inaktivierendes Agens	n	K	po (95 %)	α_u (95 %)
HA	53	2,0	0,067	0,984
Röntgenstrahlen, 0,8 % Kalbserum	19	2,6	0,177	0,969
Röntgenstrahlen, 30 % Kalbserum	20	1,5	0,168	0,949
UV-Strahlen 30 % Kalbserum	35	3,5	0,100	0,985

Tab. 5: Statistische Auswertung der Daten, die mittels Untersuchung der Virusproduktion einzelner Foci erhalten wurden.

n = Zahl der untersuchten Foci
K = Verdünnungsfaktor
po = obere Konfidenzgrenze für den Anteil von NVP-Foci bei 95 % Sicherheit
α_u = Unterer Grenzwert für den relativen Treffbereich der Onkogenität

Diese Ergebnisse erlauben folgende Überlegungen: Die 65 S-Virus-RNS mit einem Molekulargewicht von ca. 10^7 enthält ca. 30 000 Nukleotide. Die in einem Gen festgelegte Information für ein mittelgroßes Protein (etwa 200 Aminosäuren) entspricht 600 Nukleotiden (28,108). Auf einem Virus-RNS-Molekül ist daher theoretisch ausreichend Platz für die genetische Information zur Synthese von ca. 50 Proteinen. Unter der Annahme, daß alle Gene für die Infektiosität notwendig sind, entspräche der durchschnittliche Treffbereich eines Gens ca. 2 % von dem der Infektiosität. Der obere Grenzwert für die Differenz zwischen den Treffbereichen der Onkogenität und Infektiosität ist nach den Versuchen mit Röntgenstrahlen 3 - 4 % und nach den Ergebnissen mit HA und UV weniger als 2 %. Da der letztere Wert kleiner ist

als der Treffbereich eines einzigen Gens, muß die Eins-Hypothese zugunsten der Null-Hypothese verworfen werden. Dies bedeutet, anders ausgedrückt, daß entgegen der ursprünglichen Arbeitshypothese der Treffbereich für die Onkogenität gleich dem Treffbereich für die RSV-Infektiosität ist.

V. ABSCHLIESSENDE BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Zur Aufklärung des Mechanismus der Onkogenese werden die Veränderungen transformierter Zellen seit langem mit Hilfe biochemischer Methoden analysiert. Erst in neuerer Zeit ergab sich durch die Entwicklung zahlreicher Tumorvirus-Systeme die Möglichkeit, die Onkogenese von einer anderen Seite her zu untersuchen. Diese Systeme ermöglichen es, durch genetische Versuche Einblicke in einzelne Phasen der Infektion und Transformation der Wirtszellen zu gewinnen. Dem Experimentator kommen dabei besonders die in der Phagengenetik gesammelten Erfahrungen zugute. Ein Beispiel dafür ist die kürzlich gemachte Entdeckung, daß analog zu dem Verhalten von Prophagen die DNS gewisser Tumorviren nach Infektion in das Wirtszellgenom integriert wird (34,78). Die Unterdrückung der Virusproduktion transformierter Zellen wird hier durch eine Regulation der Transkription bewirkt, wie sie auch für manche Phagen bekannt ist (3,66). Obwohl derartige Befunde bei animalen Viren bisher einmalig sind, steht der Beweis dafür noch aus, daß diese Vorgänge kausal mit der Onkogenese zusammenhängen.

In vorliegender Arbeit wurde versucht, Aussagen über die relative Größe des Genombereichs für verschiedene Genfunktionen von Hühner-Leukose-Sarkomatose-Viren zu machen. Es wurden die Infektiosität, die Onkogenität, das gs- und das V-Antigen untersucht. Als Infektiosität wurde die Fähigkeit eines Virusteilchens definiert, vermehrungsfähige Nachkommen zu induzieren. Die Transformation von Hühnerfibroblasten in vitro galt als ein Maß für die Onkogenität. Das gs- und das V-Antigen sind

Virusstrukturkomponenten, die sich serologisch bzw. im Interferenzversuch nachweisen lassen. Das Interesse konzentrierte sich besonders auf die Frage nach dem Verhältnis der Treffbereiche für die Onkogenität und die Infektiosität. Im Prinzip bestand die dabei angewendete Technik darin, Virus mit einem das Genom inaktivierenden Agens zu behandeln und die Inaktivierungskinetiken der biologischen Aktivitäten der einzelnen Genprodukte zu vergleichen. Die Neigung der Inaktivierungskurven erlaubt, Schlüsse auf den relativen Treffbereich für die jeweilige Genfunktion zu ziehen.

Als inaktivierendes Agens wurde hauptsächlich Hydroxylamin verwendet, das sich in Vorversuchen als für derartige Untersuchungen geeignet erwies. Zunächst konnte gezeigt werden, daß sich die Infektiosität und die Fähigkeit zur Bildung von gs- und V-Antigen durch HA differentiell inaktivieren lassen. Aus technischen Gründen wurden diese Versuche an einem Hühner-Leukose-Virus, dem AMV, als Modell durchgeführt. Der relative Treffbereich verschiedener Genfunktionen errechnet sich aus dem geometrischen Verhältnis der Inaktivierungsanteile in $\log_{10}$ Einheiten. Der Treffbereich für die Infektiosität wurde als Bezugsgröße gleich 1 gesetzt. Zur Abschätzung der relativen Treffbereiche aus den Inaktivierungskinetiken mußte geprüft werden, ob außer der RNS nicht auch Virusstrukturbestandteile, die für die Infektion wichtig sind, inaktiviert werden. Hierzu wurde der Anteil der Virusteilchen bestimmt, der nach verschieden langer HA-Behandlung nicht mehr interferieren und deshalb vermutlich in die Zelle auch nicht mehr eindringen kann. Um die auf der Reaktion

mit dem Genom beruhenden Inaktivierungskinetiken zu erhalten, muß dieser Anteil von den Werten der beobachteten Inaktivierungskurven subtrahiert werden. Entsprechende Versuche ergaben, daß er für die beiden (in etwa gleichem Verhältnis) im AMV enthaltenen Virustypen verschieden ist (Abb. 8). Nach Korrektur der Inaktivierungskinetiken (Abb. 13) durch Abzug eines mittleren, auf die Zerstörung der V-Antigene entfallenden Anteils konnte der relative Treffbereich für das gs-Antigen abgeschätzt werden. Er entspricht etwa 1/6 dem der Infektiosität. Wenn man annimmt, daß für die Infektiosität die gesamte genetische Information der 65 S-Virus-RNS erforderlich ist (theoretisch ist sie für maximal 50 Proteine ausreichend), und daß das gs-Antigen aus einem (2) oder höchstens aus zwei Proteinen besteht (35), scheint er etwas hoch zu sein.

Die Fähigkeit zur Bildung von V-Antigen-haltigen Teilchen wird einer ähnlich durchgeführten Subtraktionsrechnung zufolge scheinbar kaum inaktiviert. Dieser Befund mag darin begründet sein, daß der Unterschied in der Inaktivierung im Vergleich zur Bildung von gs-Antigen nicht signifikant ist, und somit der relative Treffbereich die gleiche Größenordnung hätte wie der für das gs-Antigen. Wie der Kontrollversuch in Abb. 14 zeigt, ist besonders die Bestimmung des V-Antigens mit einer großen Ungenauigkeit behaftet. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit, daß nämlich der Genomabschnitt für das V-Antigen in einer durch HA nicht verletzbaren Form vorliegt, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Da die Inaktivierungskinetik der AMV-Infektiosität wesentlich steiler verläuft als die der Fähigkeit zur Bildung

von gs- und V-Antigen-haltigen Teilchen, wurde gefolgert, daß nach Infektion mit HA-behandeltem AMV nichtinfektiöse Virusteilchen entstehen. Aufgrund der Versuchsbedingungen erscheint es möglich, daß für die Synthese solcher Teilchen eine hohe Virusmultiplizität Voraussetzung ist. Der Beweis für diese Annahme ließe sich erbringen, wenn nichtinfektiöse Teilchen auch nach einem zweiten Infektionszyklus bei hoher Multiplizität nachgewiesen werden könnten. Ein derartiger Versuch konnte bisher deshalb nicht durchgeführt werden, weil die Konzentration der nichtinfektiösen Nachkommenschaft nicht hoch genug war. Ein solcher Multiplizitätseffekt ließe sich am einfachsten durch eine Komplementation der Genprodukte deuten. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre die, daß nach HA-Behandlung defekte, nicht vermehrungsfähige Teilchen entstehen, deren genetische Information aber noch ausreicht, um in der Zelle die Synthese von RNS-freien Partikeln zu induzieren. Solche nichtinfektiösen Teilchen könnten z.B. in ihrer RNS-Polymerase defekt sein. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die Kinetik der Bildung von 65 S-RNS in der Nachkommenschaft von HA-behandeltem AMV zu untersuchen.

Nachdem es gelungen war, eine differentielle Inaktivierung verschiedener Genfunktionen des AMV mit Hilfe von HA nachzuweisen, wurde die Frage nach dem Treffbereich für die Onkogenität untersucht. Aufgrund der Befunde von Goldé und Latarjet wurde als Arbeitshypothese zunächst angenommen, daß der Treffbereich für die Onkogenität kleiner als der für die Infektiosität von RSV ist (Abb. 20, Modell 1). Ein Vergleich der Inaktivierungskinetik der Onkogeni-

tät und der RSV-Infektiosität zeigte, wie erwartet, daß letztere stärker inaktiviert wird. Die Suche nach den ebenfalls zu erwartenden nicht-virusproduzierenden Foci verlief jedoch völlig negativ. Die Differenz zwischen den beiden Inaktivierungskinetiken konnte nachträglich durch eine Autointerferenz erklärt werden. Diese Autointerferenz beeinträchtigt aus methodischen Gründen vor allem die RSV-Infektiosität.

Da durch die Hydroxylamin-Behandlung die nach der Arbeitshypothese zu erwartenden Ergebnisse nicht erhalten werden konnten, wurde geprüft, ob sich eine differentielle Inaktivierung der Onkogenität und RSV-Infektiosität mit Hilfe anderer inaktivierender Agentien erzielen läßt. Auch hierbei konnten weder nach Röntgen- noch nach UV-Bestrahlung des RSV Foci vom nicht-virusproduzierenden Typ gefunden werden. Eine Abschätzung des größten, mit den vorliegenden Daten noch verträglichen Unterschiedes beider Treffbereiche ergab eine maximale Differenz von der Größenordnung eines Gens oder darunter. Hieraus wurde der Schluß gezogen, daß der Treffbereich für die Onkogenität n i c h t kleiner ist als der für die RSV-Infektiosität, d.h., daß beide gleich groß sind (s.a. Genom-Modell 0 in Abb. 20). Unter dieser Annahme und unter der Voraussetzung, daß die Genome von AMV und RSV im großen und ganzen ähnlich sind, müßte ein Komplementations- oder Rekombinationsversuch möglich sein. Eigene vorläufige Versuche in dieser Richtung ergaben eine Steigerung der Focus-Ausbeute eines HA-behandelten RSV durch Simultaninfektion mit einem HL-Virus. Dies würde bedeuten, daß Genfunktionen, die für die Transformation von Hühner-

fibroblasten notwendig sind, teilweise auch in Leukoseviren enthalten sind, die für die gleichen Zellen nicht onkogen sind. Zur Erklärung der funktionellen Bedeutung des Genom-Modells 0 lassen sich zwei Interpretationsmöglichkeiten anführen:

1. Die Genprodukte a l l e r für die Infektiosität notwendigen Gene sind an dem Prozeß der Onkogenese funktionell beteiligt. Das würde bedeuten, daß z.B. das gs-Antigen neben seiner Eigenschaft als Virusstrukturelement noch weitere Aufgaben erfüllen müßte.
2. Lediglich die Genprodukte bestimmter Gene sind Voraussetzung für die Onkogenese. Diese Organisation entspräche funktionell dem verworfenen, in Abb. 20 dargestellten Genom-Modell 1. Das abgeschätzte Verhältnis der Treffbereiche könnte dann z.B. so erklärt werden, daß die RNS eine polycistronische Translationseinheit darstellt. "Späte" Cistren oder Gene könnten nur dann in Proteine umgesetzt werden, wenn vorher alle der Startstelle für die Translation näher gelegenen Gene fehlerlos kopiert worden sind. Eine derartige Organisation scheint zumindest bei dem RNS-haltigen Poliovirus gegeben zu sein (53). Der Abschnitt mit der Information für die Onkogenität befände sich in einer solchen RNS an dem der Startstelle entgegengesetzten Ende. Die für das gs- und V-Antigen erhaltenen Treffbereichwerte des AMV wären dann so zu interpretieren, daß das gs- und das V-Antigen Produkte sehr "früher" Gene darstellen. Voraussetzung für eine solche Interpretation ist, daß jeder "Treffer" einen Fehler bei der Translation verursacht.

Auf der Grundlage der 2. Interpretationsmöglichkeit wäre es interessant, zu untersuchen, ob ein Treffer in den späten, für die Onkogenität verantwortlichen Genen die Bildung vermehrungsfähiger, nichtonkogener Viren bewirken würde. Derartige Teilchen könnten mit den gleichen Methoden nachgewiesen werden, wie sie zur Bestimmung der Infektiosität von AMV angewendet wurden. Ein positives Ergebnis würde bedeuten, daß das RSV durch Mutation zu einem HL-Virus-ähnlichen Virus werden kann. Diese Möglichkeit scheint nicht unwahrscheinlich angesichts der Tatsache, daß nichttransformierende Begleitviren aus RSV-Stämmen isoliert worden sind, die sich in ihrer Hülleigenschaft von der des RSV nicht unterschieden (36,50).

Die Diskrepanz unserer Schlußfolgerung zu den Ergebnissen von Goldé und Latarjet ist möglicherweise durch die unterschiedlichen Inaktivierungsbedingungen zu erklären. So wäre es z.B. denkbar, daß die RNS in einer spiralisierten Form im Inneren des Teilchens enthalten ist, und daß, im Gegensatz zu der Wirkung von γ-Strahlung, nur deren äußere Bereiche der Wirkung des Hydroxylamins ausgesetzt sind. Gegen eine solche Erklärung sprechen allerdings die Ergebnisse der mit Röntgen- und UV-Strahlen durchgeführten Versuche. Es ist anzunehmen, daß sowohl Röntgen-, wie in geringerem Maße UV-Strahlen, ähnlich der γ-Strahlung die Virusteilchen durchdringen können. Weiterhin bleibt die Möglichkeit, daß die Widersprüchlichkeit der Befunde auf die Unterschiede der verwendeten RSV-Stämme zurückzuführen ist. Schließlich ist auch die Verschiedenheit der Arbeitssysteme als ein möglicher Grund zu diskutieren. Abgesehen davon, daß oben genannte

Autoren wegen der von ihnen verwendeten Chorioallantoismembran-Technik die einzelnen Virusproben auf verschiedenen Embryonen titrieren mußten, wurden in der erwähnten Arbeit weder Angaben über die Gruppenzugehörigkeit des untersuchten Virus noch über die Prüfung des verwendeten Hühnerstammes auf latente Infektion bzw. deren genetische Resistenz gemacht. Dazu ist zu bemerken, daß zum Zeitpunkt der betreffenden Publikation (Anfang 1966) die Klassifizierung der HLS-Viren gerade einen gewissen Abschluß erreicht hatte, und es noch äußerst schwierig war, genetisch charakterisierte, nicht latent infizierte Hühner zu erhalten.

Nach der in vorliegender Arbeit vorgeschlagenen Hypothese über den Treffbereich der RSV-Onkogenität kann eine Zelle nur dann transformiert werden, wenn die für die RSV-Infektiosität notwendigen Gene funktionell intakt sind. Dieses Intaktsein ist in Hühnerfibroblasten identisch mit der Produktion virusspezifischer Proteine. Versuche mit solchen Zellen erlauben aber keine Entscheidung darüber, ob für die Onkogenität die Produkte oder die Spezifität bestimmter RNS-Sequenzen dieser Gene Voraussetzung sind. Die Befunde mit RSV-transformierten Säugerzellen legen die Annahme nahe, daß die Genprodukte möglicherweise nicht ausschlaggebend sind. Wie erwähnt, ist es möglich, mit bestimmten RSV-Stämmen in Säugetieren Tumoren zu induzieren und auch Säugerzellen in vitro zu transformieren. Solche Tumorzellen produzieren aber, im Gegensatz zu transformierten Hühnerfibroblasten, in der Regel kein infektiöses Virus (91). Soweit bekannt, erzeugten bis auf drei Ausnahmen (24)

alle derartigen, bisher untersuchten Tumorlinien nach Kokultivierung mit Hühnerzellen infektiöses RSV. Obgleich also in solchen Tumorzellen durch einen bisher ungeklärten Regulationsmechanismus die Produktion bestimmter virusspezifischer Aktivitäten offenbar unterdrückt ist, wird in ihnen im allgemeinen das RSV-Genom repliziert.

Wie bereits erwähnt, reicht bei DNS-haltigen Viren schon ein Teil der im Genom enthaltenen Information aus, um eine Zelle zu transformieren. Sollte die in vorliegender Arbeit aufgestellte Hypothese, daß der Treffbereich der Onkogenität gleich dem der Infektiosität von RSV ist, weiteren Prüfungen standhalten, so wäre dies ein Hinweis dafür, daß die Mechanismen der Onkogenese bei verschiedenen Tumorviren unterschiedlich ablaufen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Inaktivierungskinetiken verschiedener Genfunktionen eines Hühner-Leukose- und eines Hühner-Sarkom-Virus wurden nach Behandlung mit inaktivierenden Agenzien, hauptsächlich des Hydroxylamins, untersucht. Die Interpretation der Inaktivierungskinetiken erlaubte folgende Schlußfolgerungen: Die Kinetiken der Infektiosität und der Onkogenität entsprechen Ein-Treffer-Kurven. Die Infektion durch Hydroxylamin-behandeltes Leukosevirus führt zur Bildung von gs- und V-Antigen-haltigen nichtinfektiösen Virusteilchen. Der Treffbereich für das gs-Antigen beträgt etwa 1/6 von dem der Infektiosität.

Zur Untersuchung der Frage nach dem relativen Treffbereich der Onkogenität eines Rous-Sarkom-Virus wurde die Virusproduktion einer größeren Anzahl von Foci untersucht, die entweder durch Hydroxylamin-behandeltes oder Röntgen- bzw. UV-bestrahltes RSV induziert worden waren. Kein einziger nicht-virusproduzierender Focus konnte nachgewiesen werden. Nach statistischer Prüfung der Signifikanz dieser Ergebnisse wurde der Schluß gezogen, daß für das Rous-Sarkom-Virus der Treffbereich der Onkogenität dem der Infektiosität entspricht.

VII. LITERATURVERZEICHNIS.

1. Allen, D.W.: Avian myeloblastosis virus (AMV) biosynthesis in chick embryo cells: studies of the particles released by trypsin from the infected cells. Virology 30, 1-9 (1966)

2. Allen, D.W.: Characterization of avian leucosis group specific antigen from avian myeloblastosis virus (AMV). Biochim.Biophys.Acta 154, 288-396 (1968)

3. Aloni, J., Winocour, E. and Sachs, L.: Characterization of the SV40 specific RNA in virus yielding and transformed cells. J.Mol.Biol. 31, 415-429 (1968)

4. Altstein, A.D., Deichmann, G.I., Sarichewa, O.F., Dodonova, N.N., Tsetlin, E.M. and Vassilieva, N.N.: Oncogenic and transforming activity of hydroxylamine-inactivated SV40. Virology 33 746-748 (1967)

5. Bader, J.P.: The role of deoxyribonucleic acid in the synthesis of Rous sarcoma virus. Virology 22, 462-468 (1964)

6. Bader, J.P.: The requirement for DNA synthesis in the growth of Rous sarcoma and Rous associated viruses. Virology 26, 253-261 (1965)

7. Bader, J.P.: Metabolic requirements for infection by Rous sarcoma virus. I. The transient requirement for DNA synthesis. Virology 29, 444-451 (1966)

8. Bader, J.P.: Metabolic requirements for infection by Rous sarcoma virus. II. The participation of cellular DNA. Virology 29, 452-461 (1966)

9. Bader, J.P.: A change in growth potential of cells after conversion by Rous sarcoma virus. J.Cell.Physiol. 70, 301-308 (1968)

10. Basilico, C. and di Mayorca, G.: Radiation target size of the lytic and the transforming ability of Polyoma virus. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 54, 125-127 (1965)

11. Bauer, H.: Untersuchungen über das Myeloblastose-Virus des Huhnes (BAI-Stamm A). II. Isolierung und Charakterisierung der im Virus enthaltenen Nucleinsäure. Z.Naturf. 21b, 453-460 (1966)

12. Bauer, H.: Untersuchungen über die Struktur, Vermehrung und onkogene Wirkung der Hühner-Leukose-Sarkomatose-Viren. Habilitationsschrift Tübingen 1969

13. Bauer, H.: pers. Mitteilung

14. Bauer, H. und Schäfer, W.: Isolierung eines gruppenspezifischen Antigens aus dem Hühner-Myeloblastose-Virus (BAI Stamm A). Z.Naturf. 20b, 642-644 (1965)

15. Bauer, H. and Schäfer, W.: Origin of group-specific antigen of chicken leukosis viruses. Virology 29, 494-496 (1966)

16. Bauer, H., Bahnemann, H. und Schäfer, W.: Untersuchungen über das Myeloblastose-Virus des Huhnes (BAI Stamm A). I. Nachweis und Vermehrungskinetik des Virus in Hühnerfibroblasten-Kulturen. Z.Naturf. 20b, 959-965 (1965)

17. Bauer, H. and Graf, T.: Evidence for the possible existence of two envelope antigenic determinants and corresponding cell receptors for avian tumor viruses. Virology 37, 157-161 (1969)

18. Beard, J.W., Bonar, R.A., Heine, U., de Thé, G., and Beard, D.: Studies on the biological, biochemical and biophysical properties of avian tumor viruses. In: "Viruses, nucleic acids and cancer" pp. 344-373, Williams and Wilkins, Baltimore 1963

19. Benjamin, T.L.: Relative target sizes for the inactivation of the transforming and reproductive abilities of Polyoma virus. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 54, 121-124 (1965)

20. Biggs, P.N., Churchill, A.E., Rootes, D.G., and Chubb, R.C.: The etiology of Marek's disease. - An oncogenic herpes-type virus. Perspectives in Virology 6, im Druck

21. Bolognesi, D.P.: Ribosomal and transfer-ribonucleic acids intrinsic to the BAI strain A avian tumor (myeloblastosis) viruses. Dissertation, Duke University, Durham, North Carolina 1967

22. Bonar, R.A. and Beard, J.W.: Virus of avian myeloblastosis. XII. Chemical constitution. J.Natl.Canc.Inst. 23, 183-195 (1959)

23. Brenner, S. and Horne, R.W.: A negative staining method for high resolution microscopy of viruses. Biochim.Biophys.Acta 34, 103-110 (1959)

24. Bubeník, J. and Bauer, H.: Antigenic characteristics of the interaction between Rous sarcoma virus and mammalian cells. Virology 31, 489-497 (1967)

25. Burmester, B.R., Walter, W.G., Gross, M.A. and Fontes, A.K.: The oncogenic spectrum of two pure strains of avian leukosis virus. J.Natl.Canc. Inst. 23, 277-291 (1959)

26. Casto, B.C.: Effects of UV irradiation on the transforming and plaque-forming capacities of simian adenovirus SA7. J.Virol. 2, 641-642 (1968)

27. Cohen, S.S.: Introduction to the biochemistry of D-arabinosylnucleosides. Progr.Nucl.Acid Res. 5, 1-88 (1966)

28. Crick, F.H.C.: The recent excitement in the coding problem. Progr.Nucl.Acid Res. 1, 163-217 (1963)

29. Crittenden, L.B.: Observation on the nature of a genetic cellular resistance to avian tumor viruses. J.Natl.Canc.Inst. 41, 145-153 (1968)

30. Crittenden, L.B., Okazaki, W. and Reamer, R.H.: Genetic resistance to Rous sarcoma virus in embryo cell cultures and embryos. Virology 20, 541-544 (1963)

31. Crittenden, L.B., Stone, H.A., Reamer, R.H. and Okazaki, W.: Two loci controlling genetic cellular resistance to avian leukosis sarcoma viruses. J.Virol. 1, 898-904 (1967)

32. Defendi, V. and Jensen, F.: Oncogenicity of DNA of tumor viruses: enhancement after UV and ^{60}Co radiations. Science 157, 703-705 (1967)

33. Defendi, V., Jensen, F., and Sauer, G.: Analysis of some viral functions related to neoplastic transformation. In: "The molecular biology of viruses" (Colter, J.S. and Paranchych, W. Eds.) pp. 645-662. Academic Press New York 1968

34. Doerfler, W.: The fate of the DNA of adenovirus type 12 in baby hamster kidney cells. Proc.Natl.Acad. Sci.U.S. 60, 636-643 (1968)

35. Duesberg, P.H., Robinson, H.L., Robinson, W., Huebner, R.J., and Turner, H.C.: Proteins of Rous sarcoma virus. Virology 36, 73-86 (1968)

36. Duff, R.: A new subgroup of avian tumor viruses. Dissertation, University of Colorado 1968

37. Dulbecco, R.: Production of plaques in a monolayer tissue culture by single particles of an animal virus. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 38, 747-752 (1952)

38. Eagle, H.: Propagation in a fluid medium of human epidermoid carcinoma strain KB. Proc.Soc. Exptl.Biol.Med. 89, 362-364 (1955)

39. Eckert, E.A., Rott, R., and Schäfer, W.: Myxovirus-like structure of avian myeloblastosis virus. Z.Naturf. 18b, 339-340 (1963)

40. Eckert, E.A., Rott, R., and Schäfer, W.: Studies on the BAI strain A (avian myeloblastosis) virus. I. Production and examination of potent virus specific complement fixing antisera. Virology 24, 426-433 (1964)

41. Ellermann, V. und Bang, O.: Experimentelle Leukämie bei Hühnern. Centralbl.Bakt. Abt. I, 46, 595-606 (1908)

42. Feigl, F.: Spot tests. Vol. II Organic applications 4th Ed. Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1954

43. Freese, E., Bautz-Freese, E. and Bautz, E.: Hydroxylamine as a mutagenic and inactivating agent. J.Mol.Biol. 3, 133-143 (1961)

44. Friesen, B., and Rubin, H.: Some physicochemical and immunological properties of an avian leucosis virus (RIF). Virology 15, 387-396 (1961)

45. Fulton, F., and Dumbell, K.R.: The serological comparison of strains of influenza virus. J.gen.Microbiol. 3, 97-111 (1949)

46. Gershon, D., Hausen, P., Sachs, L., and Winocour, E.: On the mechanism of Polyoma virus-induced synthesis of cellular DNA. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 54, 1584-1592 (1965)

47. Giebler, P.: Definierung und Auswertung präparativer Ultrazentrifugierungen mit Hilfe des "performance index" (pi). Z.Naturf. 13b, 238-241 (1958)

48. Goldé, A.: Non-défectivité de la souche de virus de Rous de Schmidt-Ruppin. C.R.Acad.Sc. Paris, 262, 329-331 (1966)

49. Goldé, A. et Latarjet, R.: Dissociation, par irradiation, des fonctions oncogéne et infectieuse du virus de Rous, souche Schmidt-Ruppin. C.R.Acad.Sc. Paris, 262, 420-423 (1966)

50. Hanafusa, H., and Hanafusa, T.: Determining factor in the capacity of Rous sarcoma virus to induce tumors in mammals. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 55, 742-749 (1966)

51. Hanafusa, H.: Analysis of the defectiveness of Rous sarcoma virus. III. Determining influence of a new helper virus on the host range on susceptibility to interference of RSV. Virology 25, 248-255 (1965)

52. Ishizaki, R., and Vogt, P.K.: Immunological relationships among envelope proteins of avian tumor viruses. Virology 30, 375-387 (1966)

53. Jacobson, M.F., and Baltimore, D.: Polypeptide cleavages in the formation of poliovirus proteins. Proc. Natl.Acad.Sci.U.S. 61, 77-84 (1968)

54. Kellenberger, E., and Arber, W.: Electron microscopical studies of phage multiplication. I. A method for quantitative analysis of particle suspension. Virology 3, 245-255 (1957)

55. Kraus, W.: Eine einfache Methode zur Züchtung größerer Mengen animaler Zellen. Arch.exptl.Vet.Med. XVI, 351-353 (1963)

56. Latarjet, R., Cramer, R., and Montagnier, L.: Inactivation by UV-, X-, and γ-radiations, of the infecting and transforming capacities of Polyoma virus. Virology 33, 104-111 (1967)

57. Lea, D.E.: Actions of radiations on living cells. Cambridge University Press 1946

58. Lorenz, R.J.: Untersuchungen über die Dosis-Wirkungs-Beziehung und die Genauigkeit bei Virustitrierungen. Arch.ges.Virusf. X, 560-577 (1961)

59. Lorenz, R.J.: Schnellmethoden zur ID_{50}-Schätzung. In: "Biometrisches Seminar für Virologen", Hrsgb.: Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen 1964

60. Lunger, P.D.: The isolation and morphology of the Lucké frog kidney tumor virus. Virology 24, 138-145 (1964)

61. McCrea, J.F.: Ionizing radiations and its effect on animal viruses. Ann.N.Y.Acad.Sci. 83, 692-705 (1962)

62. Mommaerts, E.B., Sharp, D.G., Eckert, E.A., Beard, D., and Beard, J.W.: Virus of avian erythromyeloblastic leukosis. I. Relation of specific plasma particles to the dephosphorylation of adenosine triphosphate. J.Natl.Canc.Inst. 14, 1011-1025 (1954)

63. Moscovici, E., and Vogt, P.K.: Effects of genetic cellular resistance on cell transformation and virus replication in chicken hematopoietic cell cultures infected with avian myeloblastosis virus (BAI-A). Virology 35, 487-497 (1968)

64. Munroe, J.S., and Windle, W.E.: Tumors induced in primates by chicken sarcoma virus. Science 140, 1415-1416 (1963)

65. Nakata, Y., and Bader, J.P.: Studies on the fixation and development of cellular transformation by Rous sarcoma virus. Virology 36, 401-410 (1968)

66. Oda, K., and Dulbecco, R.: Regulation of transcription of the SV40 DNA in productively infected and in transformed cells. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 60, 525-532 (1968)

67. Osler, A.G., Strauss, J.Y., and Mayer, M.M.: Diagnostic complement fixation. Method.Amer.J.Syph.Gonor. and Ven.Dis. 36, 140 (1952)

68. Piraino, F.: The mechanism of genetic resistance of chick embryo cells to infection by Rous sarcoma virus Bryan strain (BS-RSV). Virology 32, 700-707 (1967)

69. Robinson, W.S., and Baluda, M.A.: The nucleic acid from avian myeloblastosis virus compared with the RNA from the Bryan strain of Rous sarcoma virus. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 54, 1686-1692 (1965)

70. Robinson, W.S., Pitkanen, A., and Rubin, H.: The nucleic acid of the Bryan strain of Rous sarcoma virus. Purification of the virus and isolation of the nucleic acid. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 54, 137-144 (1965)

71. Rott, R. und Schäfer, W.: Hydroxylamin-Empfindlichkeit des Newcastle disease Virus (NDV). Z.Naturf. 17b, 861-862 (1962)

72. Rous, P.: A transmissible avian neoplasm (sarcoma of the common fowl). J.Exptl.Med. 12, 696-705 (1910)

73. Rous, P.: A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. J.Exptl. Med. 13, 397-411 (1911)

74. Rubin, H.: A virus in chick embryo which induces resistance in vitro by the infection with Rous sarcoma virus. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 46, 1105-1119 (1960)

75. Rubin, H.: The nature of a virus-induced cellular resistance to Rous sarcoma virus. Virology 13, 200-206 (1961)

76. Rubin, H., Cornelius, A., and Fanshier, L.: The pattern of congenital transmission of an avian leukosis virus. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 47, 1058-1069 (1961)

77. Rubin, H., and Vogt, P.K.: An avian leukosis virus associated with stocks of Rous sarcoma virus. Virology 17, 184-194 (1962)

78. Sambrook, J., Westphal, H., Srinivasan, P.R., and Dulbecco, R.: The integrated state of viral DNA in SV40 transformed cells. Proc.Natl. Acad.Sci.U.S. 60, 1288-1295 (1968)

79. Sarma, P.S., Turner, H.C., and Huebner, R.J.: An avian leucosis group-specific complement fixation reaction. Application for the detection and assay of non-cytopathogenic leucosis viruses. Virology 23, 313-321 (1964)

80. Schäfer, W.: Tumorviren, Eigenschaften und Bedeutung. In: "Probleme der Verhütung von Viruserkrankungen" S. 112-133. Springer-Verlag Berlin 1967

81. Schäfer, W. und Rott, R.: Herstellung von Virusvaccinen mit Hydroxylamin. Verlauf der Inaktivierung und Wirkung des Hydroxylamins auf verschiedene biologische Eigenschaften einiger Viren. Z.f.Hyg. 148, 256-268 (1962)

82. Scholtissek, C., and Rott, R.: Synthesis of viral RNA by a chemically inactivated influenza virus. Nature 199, 200-201 (1963)

83. Schuster, H.: The reaction of tobacco mosaic virus ribonucleic acid with hydroxylamine. J.Mol. Biol. 3, 447-457 (1961)

84. Schuster, H., and Wittmann, H.G.: The inactivating and mutagenic action of hydroxylamine on tobacco mosaic virus ribonucleic acid. Virology 19, 421-430 (1963)

85. Šimkovic, D., Valentova, N., and Thurzo, V.: An in vitro system for the detection of the Rous sarcoma virus in the cells of the rat tumor XC. Neoplasma 9, 104-106 (1962)

86. Simpson, R.W., and Hirst, G.K.: Genetic recombination among influenza viruses. I. Cross reactivation among the plaque forming capacity as a method for selecting recombinants from the progeny virus of influenza A strains. Virology 15, 436-451 (1961)

87. Steck, F.T., and Rubin, H.: The mechanism of interference between avian leukosis virus and Rous sarcoma virus. I. Establishment of interference. Virology 29, 628-641 (1966)

88. Steck, F.T., and Rubin, H.: The mechanism of interference between avian leukosis virus and Rous sarcoma virus. II. Early steps of infection by RSV of cells under conditions of interference. Virology 29, 642-653 (1966)

89. Svet-Moldavsky, G.J., and Shoreekova, A.S.: Sarcoma in albino rats treated during the embryonic stage with Rous sarcoma virus. Nature 182, 1452-1453 (1957)

90. Svoboda, J.: Presence of chicken tumor virus in the sarcoma of the adult rat inoculated after birth with Rous sarcoma virus. Nature 186, 980-981 (1960)

91. Svoboda, J.: Basic aspects of the interaction of oncogenic viruses with heterologous cells. Int. Rev.of exp.Pathol. 5, 25-66 (1966)

92. Temin, H.: The effects of Actinomycin D on growth of Rous sarcoma virus in vitro. Virology 20, 577-582 (1963)

93. Temin, H.: The participation of DNA in Rous sarcoma virus production. Virology 23, 486-494 (1964)

94. Temin, H., and Rubin, H.: Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture. Virology 6, 669-688 (1958)

95. Temin, H.M., and Rubin, H.: A kinetic study of infection of chick embryo cells in vitro by Rous sarcoma virus. Virology 8, 209-222 (1959)

96. Timoféeff-Ressovsky, N.W. und Zimmer, K.G.: "Biophysik Bd. I. Das Trefferprinzip in der Biologie". S. Hirzel Verlag, Leipzig 1947

97. Vogt, P.K.: The infection of chicken fibroblast cultures by avian myeloblastosis virus. In: "Viruses, Nucleic Acids and Cancer", pp. 374-386. Williams and Wilkins, Baltimore, Md. 1963

98. Vogt, P.K.: Avian tumor viruses. Adv.Virus Res. 11, 293-385 (1965)

99. Vogt, P.K.: A heterogeneity of Rous sarcoma virus revealed by selectively resistant chick embryo cells. Virology 25, 1237-1247 (1965)

100. Vogt, P.K.: Nonproducing state of Rous sarcoma cells: Its contagiousness in chicken cell cultures. J.Virol. 1, 729-737 (1967)

101. Vogt, P.K.: A virus released by "nonproducing" Rous sarcoma cells. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 58, 801-808 (1967)

102. Vogt, P.K.: Phenotypic mixing in the avian tumor virus group. Virology 32, 1708-1717 (1967)

103. Vogt, P.K., and Ishizaki, R.: Reciprocal patterns of genetic resistance to avian tumor viruses in two lines of chickens. Virology 26, 664-672 (1965)

104. Vogt, P.K., and Ishizaki, R.: Patterns of viral interference in the avian leukosis and sarcoma complex. Virology 30, 368-374 (1966)

105. Vogt, P.K., and Rubin, H.: Localization of infectious virus and viral antigen in chick fibroblasts during successive stages of infection with Rous sarcoma virus. Virology 13, 528-544 (1961)

106. Vogt, P.K., and Rubin, H.: Studies on the assay and multiplication of avian myeloblastosis virus. Virology 19, 92-104 (1963)

107. Watson, J.D.: The properties of X-ray inactivated bacteriophage. II. Inactivation by indirect effects. J.Bacteriol. 63, 473-485 (1952)

108. Watson, J.D.: "The molecular biology of the gene". Benjamin Inc., New York 1965

109. Zilber, L.A., Lapin, B.A., and Adgighytov, F.I.: Pathogenicity of Rous sarcoma virus for monkeys. Nature, 205, 1123-1124 (1965)

Lebenslauf

Am 28. 9. 1944 wurde ich als jüngster von zwei Söhnen des Dipl.-Bauingenieurs Robert Graf und seiner Ehefrau Margarethe in Wien geboren. Im Jahre 1951 emigrierten wir nach Caracas, Venezuela, wo meine Eltern heute noch leben. In Caracas besuchte ich die Humboldt-Schule bis zu meinem Abitur im Jahre 1962. Nach dem Abitur begann ich in München mit dem Biologie-Studium, welches ich vom 7. Semester ab in Tübingen fortführte. In den Sommerferien 1965 und 1966 arbeitete ich bei Dr. Gernot Bergold in der Abteilung für Virusforschung am Instituto Venezolano de Investigaciones Cientifícas, Caracas. Im Frühjahr 1966 arbeitete ich 2 Monate in der Abteilung von Professor Schäfer am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen. Im November 1966 begann ich im gleichen Institut meine Dissertations-Arbeit unter der wissenschaftlichen Anleitung von Herrn Professor Dr. Werner Schäfer und Dr. Heinz Bauer über das Thema: "Untersuchungen über den relativen Treffbereich verschiedener Genfunktionen von Hühner-Leukose-Sarkomatose-Viren". Im gleichen Jahre heiratete ich die Amerikanerin Lynn Felder. Im Jahr danach wurde unsere Tochter geboren.

Meine akademischen Lehrer waren: Genetik: Prof. Dr. W. Seyffert, Prof. Dr. F. Kaudewitz; Mikrobiologie: Prof. Dr. H. Zähner; Biochemie: Prof. Dr. G. Weitzel, Prof. Dr. F. Lynen; Botanik: Prof. Dr. H. Merxmüller, Dr. K. Drumm; Zoologie: Prof. Dr. H. Autrum; Organische Chemie: Prof. Dr. R. Huisgen; Anorganische Chemie: Prof. Dr. E. Wiberg.

difo-druck · schmacht bamberg